

Antikörpervarianten mit verbesserter Affinität

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Holger Thie
aus Bielefeld

1. Referent:	Prof. Dr. Stefan Dübel
2. Referent:	Prof. Dr. Jürgen Bode
eingereicht am:	23.07.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	25.09.2008
Druckjahr:	2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation:

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Artikel:

Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M., Schirrmann, T.: 2008, Affinity maturation by phage display. *Meth Mol Biol* (in press).

Tagungsbeiträge:

Thie, H., Mertens, S., Schirrmann, T., Hust, M., Dübel, S.
Comparison of antibody fragment multimerization strategies. (Poster)
IBC's 18th Annual International Conference Antibody Engineering, Dezember 2007, San Diego, CA, USA.

Patente:

Thie, H., Hust, M., Toleikis, L., Schirrmann, T., Dübel, S.: 2008, Recombinant anti-MUC1 antibodies (EP08160727.7).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2005 bis Juni 2008 in der Abteilung Biotechnologie des Instituts für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig angefertigt.

Zu Beginn danke ich Herrn Prof. Dr. Stefan Dübel für die Möglichkeit zur Mitarbeit und Promotion in seiner Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des sehr interessanten Themenkomplexes dieser Dissertation, seine vielen Anregungen und die Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bode danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Frau Prof. Dr. Petra Dersch für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Michael Hust und Dr. Thomas Schirrmann danke ich ganz besonders für ihre Aufmerksamkeit, Diskussionsbereitschaft und das freundschaftliche Verhältnis.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang untereinander danken. Stefanie Mertens danke ich für ihre praktische Unterstützung bei den Experimenten.

Dr. Lars Toleikis danke ich für die Isolierung und die Bereitstellung des IIB6 scFv Antikörpers.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und den Rückhalt bedanken.

Zuletzt geht mein herzlichster Dank an Nicole. Schön, dass es dich gibt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Zusammenfassung	1
1.1 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Antikörper - allgemein	3
2.1.1 Antikörperfragmente	5
2.2 Antikörper Phagen-Display-Technologie	6
2.2.1 Bakteriophage M13	6
2.2.2 Antikörper Phagen-Display	7
2.2.3 Antikörpergenbibliotheken	8
2.2.4 Selektion spezifischer Antikörperphagen (Panning)	10
2.3 Affinität und Avidität	11
2.4 Affinitätsreifung von Antikörpern	12
2.4.1 Affinitätsreifung <i>in vivo</i>	12
2.4.2 Affinitätsreifung <i>in vitro</i>	13
2.5 Multimerisierung von Antikörperfragmenten	16
2.6 Mammakarzinom	18
2.6.1 Epidemiologie	18
2.6.2 Ätiologie	18
2.6.3 Symptomatik, Diagnose, Verlauf und Therapie	19
2.6.4 Antikörper basierte Therapie	19
2.7 MUC1 als Tumorantigen und potentiell Ziel einer Antikörpertherapie	20
2.7.1 Antikörper gegen MUC1	23
2.8 Ziele der Arbeit	24
3 Material	25
3.1 Verbrauchsmaterialien	25
3.2 Geräte	25
3.3 Chemikalien	27
3.4 Puffer und Lösungen	27
3.5 Nährmedien und Supplemente	29
3.5.1 Prokaryotische Kultivierung	29
3.5.2 Eukaryotische Kultivierung	30
3.6 Bakterienstämme	30
3.7 Zelllinien	30
3.8 Plasmide	31
3.9 Oligonukleotide	31
3.10 Peptide	32
3.11 Enzyme	33

3.12	Antikörper	33
3.13	Kit-Systeme	33
3.14	Computerprogramme und Datenbanken	34
3.15	Sonstiges	35
4	Methoden	37
4.1	Molekularbiologische Methoden	37
4.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	37
4.1.2	Amplifikation von DNA	37
4.1.2.1	<i>Error-prone</i> -PCR	37
4.1.2.2	Kolonie-PCR	38
4.1.2.3	PCR zur Erzeugung neuer DNA-Abschnitte	38
4.1.3	Aufreinigung von DNA	38
4.1.4	Präzipitation von DNA	39
4.1.5	Agarosegelelektrophorese	39
4.1.6	DNA Konzentrationsbestimmung - photometrisch	39
4.1.7	Enzymatische Restriktion von DNA	39
4.1.8	DNA-Dephosphorylierung	40
4.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	40
4.1.10	DNA-Sequenzierung	41
4.2	Mikrobiologische Methoden	41
4.2.1	Transformation von <i>E. coli</i>	41
4.2.2	Infektion von <i>E. coli</i> und Produktion von M13K07-Antikörperphagen	41
4.2.3	Titerbestimmung von M13-Antikörperphagen	42
4.2.4	Selektion mit Antikörperphagenbibliotheken	42
4.2.4.1	<i>Off-rate</i> -Panning	42
4.2.4.2	Panning in Lösung	43
4.2.4.3	Kompetitives Panning in Lösung	43
4.2.5	Herstellung von Glycerinkulturen	44
4.2.6	Produktion von scFv-Fragmenten im MTP-Maßstab	44
4.2.7	Produktion von scFv-Fragmenten im Schüttelkolben-Maßstab	44
4.3	Biochemische Methoden	45
4.3.1	Periplasma-Präparation von <i>E. coli</i>	45
4.3.2	IMAC-Aufreinigung von scFv-Fragmenten	45
4.3.3	SDS-PAGE	45
4.3.4	Coomassiefärbung von Proteingelen	46
4.3.5	Quantifizierung von Proteinen	46
4.3.6	Western Blot	46
4.3.7	Immunfärbung	47
4.3.8	Antigen-ELISA	47
4.3.9	Epitop-Kartierung	47
4.4	Zellbiologische Methoden	48
4.4.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	48
4.4.2	Durchflusszytometrie (FACS)	48
4.5	Biophysikalische Methoden	49
4.5.1	Größenausschlusschromatographie (SEC)	49
4.5.2	Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	49

5	Ergebnisse	51
5.1	Erstellung von mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken	51
5.1.1	Bibliothek „A“	51
5.1.2	Bibliothek „B“	52
5.2	Affinitätspannings	53
5.2.1	<i>Off-rate</i> -Panning in Mikrotiterplatten	53
5.2.2	Panning in Lösung	55
5.2.3	Kompetitives Panning in Lösung	57
5.3	ELISA mit titrierten Kulturüberständen	59
5.4	Oberflächenplasmonresonanz-Analysen mit Kulturüberständen zwecks Affinitäts- <i>Ranking</i>	60
5.5	Produktion und Aufreinigung	61
5.5.1	Quantifizierung der aufgereinigten scFv-Fragmente	62
5.6	ELISA mit aufgereinigten scFv-Fragmenten	63
5.7	Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz	64
5.8	Epitop-Kartierung	66
5.9	Analyse des Aggregationsverhaltens mittels Größenausschlusschromatographie . .	68
5.10	Stabilitätsanalyse	70
5.11	Analyse der Bindungseigenschaften an Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie	71
5.12	Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenzen	73
5.12.1	<i>Alignment</i> der Aminosäuresequenzen	73
5.12.2	Bestimmung der <i>Humanness</i> und der Keimbahn-Homologie	75
5.12.3	Auffinden von ungepaarten Cysteinresten und möglichen <i>N</i> -Glykosylierungs- stellen	76
5.13	Multimerisierung von scFv-Fragmenten	77
6	Diskussion	81
6.1	Affinitätsreifung von α -MUC1-Antikörperfragmenten	81
6.2	Multimerisierung von scFv-Fragmenten	90
6.3	Fazit	93
7	Ausblick	95
8	Quellenverzeichnis	97
A	Anhang	113
A.1	Produktion und Aufreinigung von scFv-Fragmenten	113
A.2	<i>Humanness</i> -Analysen	114
A.3	SPR-Analysen zur Affinitätsbestimmung	116
A.4	Stabilitätsanalyse	118
A.5	ELISA-Analyse mit verdünnten multimeren scFv-Fragmenten	119

Abbildungsverzeichnis

2.1	Struktur von IgG Antikörpern und Antikörperfragmenten	4
2.2	M13 Phage - schematische Darstellung	7
2.3	M13 Antikörperphage + Phagemid - schematische Darstellung	8
2.4	Herstellung von Antikörpergenbibliotheken - schematische Darstellung	9
2.5	Ablauf der Selektion spezifischer Antikörperphagen (Panning) - schematische Darstellung	11
2.6	Verwendete Multimerisierungsdomänen in Fusion mit einem scFv-Fragment - schematische Darstellung	17
2.7	MUC1 - schematische Darstellung	21
2.8	Vergleich der Glykosylierungsmuster der VNTR-Bereiche von normalem und tumorassoziiertem MUC1	22
5.1	Vier <i>Error-prone</i> -PCRs: Bibliothek „A“	51
5.2	Klonierung der Antikörpergenbibliothek - schematisch	52
5.3	ELISA: <i>Off-rate</i> -Panning	54
5.4	Western blot: Kulturüberstände <i>Off-rate</i> -Panning	55
5.5	ELISA: Panning in Lösung	56
5.6	Western blot: Kulturüberstände Panning in Lösung	57
5.7	ELISA: Kompetitives Panning in Lösung	58
5.8	Western blot: Kulturüberstände kompetitives Panning in Lösung	59
5.9	ELISA mit titrierten Kulturüberständen	60
5.10	SPR-Analysen mit Kulturüberständen	61
5.11	Produktion und Aufreinigung von HT186-D11 scFv	62
5.12	ELISA mit definierten scFv Konzentrationen (Verdünnungsreihe)	64
5.13	Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz für HT186-D11	65
5.14	Epitop-Kartierung	67
5.15	Größenausschlusschromatographie	69
5.16	ELISA: scFv-Stabilitätstest	70
5.17	Durchflusszytometrie	72
5.18	Beispielhafte <i>Humanness</i> -Analyse von HT186-D11	75
5.19	Schematische Darstellung der scFv-Multimere und der Klonierungsstrategie	77
5.20	ELISA mit verdünnten multimeren scFv-Fragmenten	79
5.21	ELISA mit verschiedenen D1.3 Antikörperphagen	80
A.1	Produktion und Aufreinigung scFv-Fragmente	113
A.2	<i>Humanness</i> -Analyse Teil 1	114
A.3	<i>Humanness</i> -Analyse Teil 2	115
A.4	Sensogramme der Affinitätsbestimmung - Teil 1	116
A.5	Sensogramme der Affinitätsbestimmung - Teil 2	117
A.6	ELISA: scFv-Stabilitätstest	118
A.7	ELISA mit verdünnten multimeren scFv-Fragmenten	119

Tabellenverzeichnis

2.1	Brustkrebs-Risikofaktoren	18
4.1	<i>Error-prone</i> -PCR	37
4.2	Kolonie-PCR	38
4.3	PCR zur Erzeugung neuer DNA-Abschnitte	38
4.4	Restriktionsverdau	40
4.5	Zusammensetzung Ligation	40
4.6	Sequenzier-PCR	41
4.7	Zusammensetzung SDS-PAA-Proteingele	46
5.1	Übersicht: Antikörpergenbibliotheken	53
5.2	Panning in Lösung	56
5.3	Kompetitives Panning in Lösung	58
5.4	Übersicht: Klone für die weitere Charakterisierung	59
5.5	Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten scFv Fragmente	63
5.6	Affinitätsbestimmung der α -MUC1-scFv-Antikörperfragment	66
5.7	Sequenzübersicht: Epitop-Kartierung	67
5.8	Vergleich der Aminosäuresequenzen	74
5.9	<i>Humanness</i> -Analyse und Sequenzhomologie zu Keimbahn-Gensegmenten	76
5.10	Keimbahn-Genfamilien	76
5.11	Produktionsausbeuten multimerisierter scFv-Fragmente	78

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
α	anti
A	Absorption
A _{xyz}	Absorption bei Wellenlänge xyz nm
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAD	Biotin-Aktzeptordomäne (<i>biotin acceptor domain</i>)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat p-Toluidin Salz
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CBS	<i>citrate buffered saline</i>
CBP	<i>calmodulin binding peptide</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementary determining region</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
C _H	konstante Domäne der schweren Kette
C _L	konstante Domäne der leichten Kette
cm	Zentimeter
Cys	Cystein
d	Tag
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
d. h.	das heißt
DL	Durchlauf
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	<i>deoxyribonucleicacid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol

Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
Fc	<i>fragment cristallizable</i>
FCS	<i>foetal calf serum</i>
Fd	<i>fragment difficult</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fl-1	Fluoreszenz 1 (Messsignal Durchflusszytometrie)
FR	<i>Framework</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
Fv	<i>fragment variable</i>
g	Gramm
ger.	gereinigt
°C	Temperatur in Grad Celsius
$\times g$	Schleuderziffer, vielfaches der Erdbeschleunigung ($9,81 \frac{m}{s^2}$)
h	Stunde
HAMA	Humane-Anti-Maus-Antikörper-Antwort
HC	<i>heavy chain</i>
His	Histidin
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig(A,D,E,G,M)	Immunglobulin (A,D,E,G,M)
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k_a	Assoziationsrate $[\frac{1}{M \cdot s}]$
K_A	Gleichgewichtsassoziationskonstante $[\frac{1}{M}]$
k_d	Dissoziationsrate $[\frac{1}{s}]$
K_D	Gleichgewichtdissoziationskonstante [M]
LC	<i>light chain</i>
M	Molar
mAU	Milli- <i>absorption units</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
min	Minute
mk	monoklonal
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MTP	Mikrotiterplatte
MTT	3(4,5-dimethylthiazol-2yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUC1	Mucin 1
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid

NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
p. a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>phage dilution buffer</i>
PEM	<i>polymorphic epithelial mucin</i>
PET	Positronenemissionstomographie
pk	polyklonal
PM	Punktmutation
PP	Polypropylen
PPP	Periplasma Präparation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>rotations per minute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RU	<i>resonance units</i>
s	Sekunde
SA	Streptavidin
SB	<i>Streptabody</i>
scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
spez.	spezifisch
SPR	<i>surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonresonanz)
s. o.	siehe oben
SSC	<i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
u. a.	unter anderem
ÜKS	Überkopfschüttler
üN	über Nacht
vgl.	vergleiche
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
z. B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Mucin 1 (MUC1) ist ein Transmembranglykoprotein, das apikal auf der Oberfläche von Epithelzellen in verschiedenen Drüsengeweben exprimiert wird. Seine extrazelluläre Domäne besteht hauptsächlich aus einer variablen Anzahl von 20 Aminosäuren umfassenden *Tandem Repeats* (VNTR), die dicht mit *O*-Glykosylierungen besetzt sind. In vielen Adenokarzinomen, u. a. Brustkrebs, wird MUC1 überexprimiert und besitzt deutlich veränderte *O*-Glykosylierungsmuster. Die aberranten Glykosylierungen des tumorassoziierten MUC1 machen neue Peptidepitope zugänglich und stellen selbst Neoantigene dar. Das humane *single chain Fv* (scFv) Antikörperfragment IIB6 wurde in einer vorhergehenden Arbeit (Toleikis, 2004) aus einer Antikörpergenbibliothek mittels Phagen-Display gegen tumorassoziiertes MUC1 selektiert. Es besitzt jedoch nur eine niedrige Affinität zu MUC1 ($K_D = 2,3 \cdot 10^{-7}$ M) und bindet an ein Peptid-Epitop aus dessen VNTR-Region.

Das Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Charakterisierung hochaffiner Antikörperfragmente gegen MUC1 durch Affinitätsreifung von IIB6 scFv. Mittels sequenzieller *Error-prone*-PCR wurden zufällige Punktmutationen in das IIB6 scFv Genfragment eingebracht und Antikörpergenbibliotheken generiert. Durch stringente Selektionsmethoden wurden Antikörperklone mit verbesserten Bindungseigenschaften zu MUC1 isoliert. Sechs unterschiedliche scFv-Klone wurden in *E. coli* produziert und deren Affinität zu MUC1 mittels ELISA und Oberflächenplasmonresonanz bestimmt und verglichen. Für den scFv-Klon HT186-D11 wurde eine sehr hohe Affinität zu MUC1 von $K_D = 5,7 \cdot 10^{-10}$ M gemessen, was einer 400fachen Steigerung der Affinität gegenüber dem Ausgangsantikörper IIB6 scFv entsprach. Die affinitätsgereiften scFv-Klone erkannten das gleiche Peptidepitop (RPAP) in der VNTR-Region von MUC1 wie der Ursprungsklon. Fünf affinitätsgereifte scFv-Klone zeigten außerdem eine erheblich verringerte Aggregationsneigung bzw. Dimerbildung und gleichzeitig eine deutliche Verbesserung der Langzeitstabilität verglichen mit IIB6 scFv. Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte für die affinitätsgereiften Antikörper-Klone eine spezifische Bindung an MUC1⁺-Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Eine bioinformatische Analyse zeigte, dass gehäuft Aminosäureaustausche im CDR2-Bereich von V_L auftraten.

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten affinitätsgereiften MUC1-spezifischen scFv-Fragmente zeigen ein großes Potential für die Diagnose und Behandlung von MUC1⁺-Adenokarzinomen.

In dieser Arbeit wurden zusätzlich mehrere Strategien zur Erhöhung der apparenten Affinität von Antikörperfragmenten getestet, indem scFv-Fragmente mit verschiedenen Multimerisierungsdomänen fusioniert wurden. Eine Rangfolge der Multimerisierungsdomänen (BAD > ZIP > dHLX > p53 > TetraZIP) bezüglich ihrer Anwendbarkeit wurde unter Berücksichtigung der Steigerung der apparenten Affinitäten (max. 25fach) und ihres Einflusses auf die Produzierbarkeit erstellt. Zusätzlich wurde die Phagen-Display-Kompatibilität der Multimerisierungsdomänen untersucht.

1.1 Abstract

Mucin 1 (MUC1), a transmembrane glycoprotein, is apically expressed in many epithelial cells of ductal or gland tissue. The extracellular domain is mainly constituted of a variable number of a 20 amino acid tandem repeat (VNTR) and is heavily *O*-glycosylated with long and branching sugar chains. In many adenocarcinomas (e. g. breast cancer) MUC1 is overexpressed in an apolar manner and bearing aberrant, less dense glycosylation patterns. This results in new epitopes based on the aberrant glycosylations or the peptide backbone of MUC1. In a former study the recombinant human antibody fragment IIB6 scFv was isolated from an antibody-gene library against tumor-associated MUC1 (Toleikis, 2004). This antibody fragment binds a peptide epitope within the VNTR-region of MUC1 with low affinity ($K_D = 2,3 \cdot 10^{-7}$ M).

The aim of this work was the isolation and characterization of high affinity binders to MUC1 by an affinity maturation of IIB6 scFv. Random point mutations were introduced into the IIB6 scFv gene by error-prone-PCR and subsequently antibody-gene libraries, based on mutated IIB6 scFv genes, were constructed. These libraries were screened for high affinity binders by using different stringent panning strategies. Six single scFv-clones were chosen for further characterization and produced in *E. coli*. The affinity of the α -MUC1-scFv-fragments were estimated by ELISA binding studies and finally determined by surface plasmon resonance. For HT186-D11 a very high affinity to MUC1 ($K_D = 5,7 \cdot 10^{-10}$ M) was observed. Compared to IIB6 this results in an affinity increase by a factor of 400. The same peptide-epitope (RPAP) in the VNTR-region was determined for all tested clones (incl. IIB6 scFv). For five affinity matured clones a reduced tendency for aggregation or dimerization respectively was determined by size exclusion chromatography. These scFv-clones also showed a significant higher long-term stability (max. 30 d, 37 °C). Binding to tumor cell-associated MUC1 was shown for all tested scFv-fragments by flow cytometry using three different adenocarcinoma cell-lines. An alignment of the amino acid sequences showed different amino acid substitutions along the whole sequence, but for the affinity matured candidates a cluster of amino acid substitutions was observed within the CDR2-region of V_L .

The affinity matured antibody fragments isolated and characterized in this work show a high potential for diagnostic and antibody-based therapies for the treatment of MUC1⁺-adenocarcinomas.

Additionally, this work included different strategies to increase the apparent affinity (avidity) of antibody fragments were investigated by the fusion of scFv-fragments to different multimerization domains. A ranking of the domains (BAD > ZIP > dHLX > p53 > TetraZIP) paying respect to the gain in apparent affinity (up to a factor of 25) and production properties was accomplished. Additionally the phage display compatibility of the multimerization domains was determined.

2 Einleitung

2.1 Antikörper - allgemein

Antikörper (Immunglobuline) sind ein wesentlicher Bestandteil des Immunsystems von Wirbeltieren (Vertebraten ab der Überklasse der Gnathostomata) und spielen eine Schlüsselrolle bei der adaptiven Immunantwort dieser Organismen. Sie erkennen und binden spezifisch an körperfremde Substanzen (den so genannten Antigenen, z. B. Toxine oder Mikroorganismen) und markieren diese für weitere Teile des humoralen Immunsystems. Es existieren fünf Klassen (Isotypen) von Antikörpern: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Diese werden von B-Lymphozyten gebildet. Je nachdem welcher Isotyp an der Antigenbindung beteiligt ist, kann eine Neutralisation, Opsonisierung, Komplementaktivierung oder die Aktivierung weiterer Teile des Immunsystems erfolgen. Bei einer primären Immunantwort, d. h. dem ersten Kontakt mit dem Antigen, sind hauptsächlich Antikörper der Klasse IgM an der Erkennung und Bindung des Antigens beteiligt. Nach dem Antigen-Stimulus kann in den B-Zellen ein Isotypenwechsel von IgM oder IgD hin zu IgG, IgE oder IgA erfolgen. Nach Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen werden hauptsächlich Antikörper des Isotyps IgG gebildet, die mit $\approx 80\%$ den Hauptbestandteil der Immunglobuline im humanen Serum ausmachen (Janeway *et al.*, 2002).

IgG Antikörper bestehen als Heterotetramer aus jeweils zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Aminosäureketten mit einer molekularen Masse von ≈ 150 kDa. Dabei entfallen 2×50 kDa auf die schwere Kette und 2×25 kDa auf die leichte Kette. Die Struktur der IgG Antikörper (vgl. Abb. 2.1 A, D) wird durch Disulfidbrücken und nicht kovalente Bindungen zwischen den vier Aminosäureketten stabilisiert und aufrecht erhalten. Die schwere Kette (γ -Kette bei IgG) unterteilt sich in eine Tandemserie von Segmenten mit jeweils ≈ 110 Aminosäuren (≈ 12 kDa). Im N-terminalen Bereich der schweren Kette befindet sich die variable Region (V_H), der sich eine konstante Domäne anschließt (C_H1). Dieser Domäne folgt ein kurzer Abschnitt mit großer räumlicher Flexibilität, der als *Hinge*-(Scharnier-)Region bezeichnet wird und die C_H1 -Domäne mit den Domänen C_H2 und C_H3 verbindet. In der *Hinge*-Region sind die beiden schweren Ketten mittels Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Darüber hinaus stabilisieren starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den C_H3 Bereichen die Verbindung der beiden schweren Ketten (Janeway *et al.*, 2002).

Die leichten Ketten werden in die Klassen λ oder κ unterschieden, wobei keine funktionellen Unterschiede zwischen den beiden Klassen bestehen. Das Verhältnis zwischen λ und κ liegt beim Menschen bei 2:3 (Abbas *et al.*, 2007). Leichte Ketten bestehen, unabhängig ob λ oder κ , aus einer N-terminalen, variablen (V_L) Domäne und einer C-terminalen, konstanten (C_L) Domäne. Über Disulfidbrücken zwischen C_L und C_H1 sind die leichten Ketten kovalent mit den

schweren Ketten verknüpft. Die variablen Domänen beider Ketten bilden zusammen eine der beiden Antigenbindungsregionen (Fv) des Antikörpers (vgl. Abb. 2.1 E).

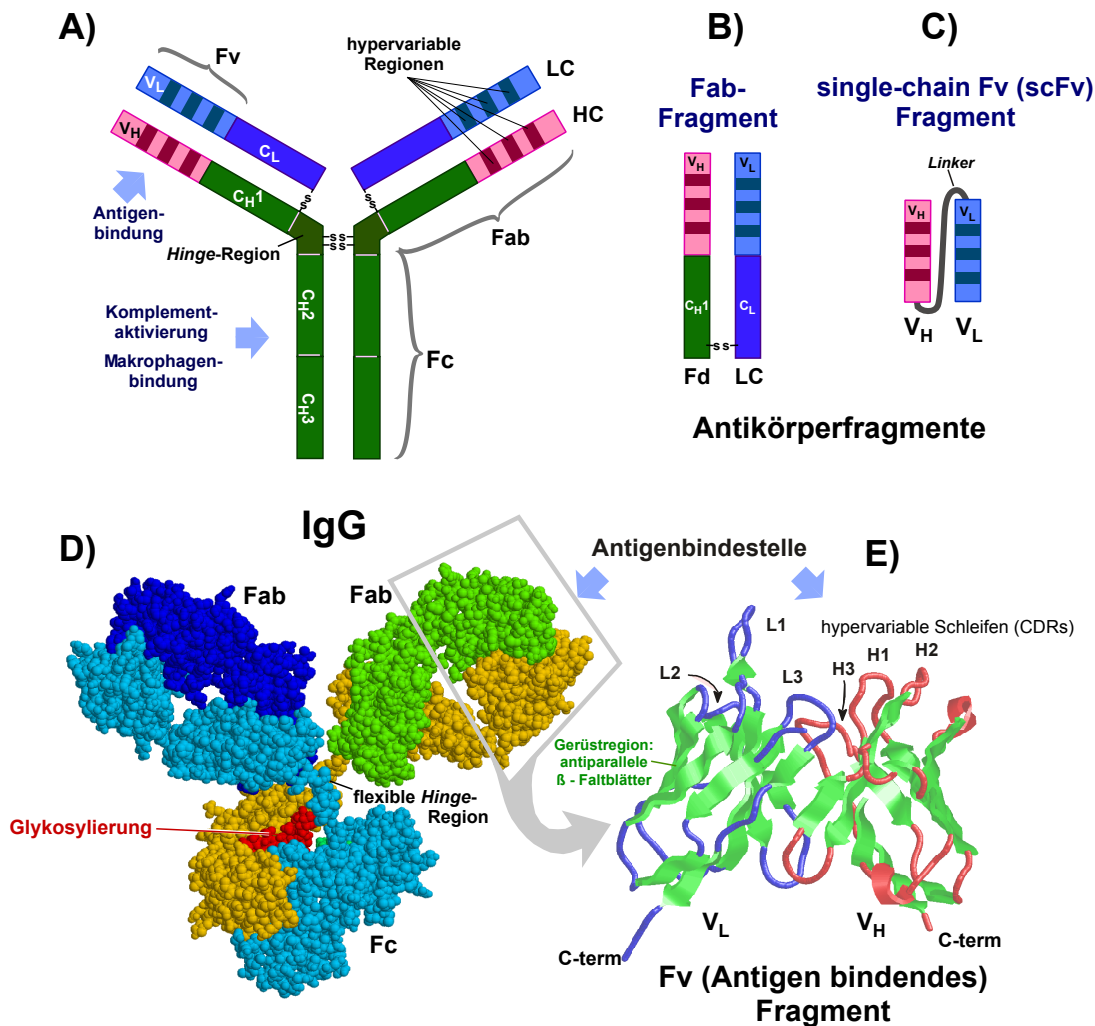


Abb. 2.1: Struktur von IgG Antikörpern und Antikörperfragmenten

A) Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers **B)** Schematische Darstellung eines Fab-Fragments **C)** Schematische Darstellung eines scFv-Fragments **D)** 3D-Struktur („Space-fill“-Modell) eines IgG-Antikörpers nach Röntgenstrukturanalyse **E)** Schematische Band-Darstellung der Fv-Region eines IgG-Antikörpers, die Schleifen der CDR-Bereiche sind gesondert gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Dübel (2007).

In diesen Bereichen finden sich in jeder Kette jeweils drei Sequenzabschnitte (CDR) mit 3-20 Aminosäuren (Griffiths *et al.*, 1993), die sich durch hypervariable Sequenzen von den Gerüstbereichen (*Framework*-Regionen) unterscheiden. Die insgesamt sechs CDR-Bereiche liegen im nativ gefalteten Zustand des Antikörpers in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander und bilden an der Außenseite des Antikörpers die Antigenbindestelle (Paratop), welche durch die *Framework*-Regionen strukturell stabilisiert wird. Die Antigenbindestelle formt eine komplementäre Oberfläche zur antigenen Determinante (Epitop) und vermittelt dadurch die Spezifität des An-

tikörpers. Die Bindung zwischen Antigen und Antikörper erfolgt nicht kovalent und basiert auf Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen und Van-der-Waals-Kräften (Voet *et al.*, 2002).

Die C_H2 und C_H3 Regionen der schweren Ketten bilden im assemblierten IgG den Fc-Teil. Dieser Bereich des Antikörpers ist nicht direkt an der Antigenbindung beteiligt, sondern dient zur Vermittlung von Effektorfunktionen für weitere Teile des Immunsystems. Die Komplementaktivierung und eine Makrophagenbindung kann durch den glykosylierten C_H2 Bereich hervorgerufen werden. Der C_H3 Bereich kann z. B. an spezielle Plasmaproteine binden. Durch die Fähigkeit, neben der Antigenbindung auch weitere Teile der körpereigenen Immunabwehr zu stimulieren, stellen Antikörper einen zentralen Bestandteil der humoralen Immunabwehr und somit das Bindeglied zwischen humoralem und zellulärem Immunsystem dar (Abbas *et al.*, 1996; Janeway *et al.*, 2002).

2.1.1 Antikörperfragmente

In einigen Anwendungsbereichen von Antikörpern kann es vorteilhaft sein, kleinere Antikörperfragmente zu verwenden. Dies ist der Fall, wenn eine Antigenbindung erforderlich ist, aber die Vermittlung von Effektorfunktionen durch den Fc-Teil eines IgG Antikörpers nicht gewünscht ist. Bei der Neutralisierung von Toxinen kann dies beispielsweise der Fall sein. Zudem haben Antikörperfragmente eine schnellere systemische *Clearance* (Ausscheidung über die Niere) und erlauben eine verbesserte Tumورpenetration im Vergleich mit IgG-Antikörpern (Beckman *et al.*, 2007). Durch Fragmentierung eines IgGs mit Hilfe von Papain kann der Antikörper in zwei Antigen-bindende Fragmente (Fab) zerlegt werden (Liddell & Weeks, 1996). Die Fab-Fragmente bestehen aus der kompletten leichten Kette und dem V_H- und C_H1-Bereich der schweren Kette. Die Ketten sind über eine Disulfidbrücke im C-terminalen Bereich beider Ketten kovalent miteinander verbunden. Fab-Fragmente haben eine ähnliche Stabilität wie die korrespondierenden IgG Antikörper. Mit Hilfe von Pepsin ist es möglich, IgGs in der *Hinge*-Region nahe C_H2 zu spalten und bivalente F(ab')₂-Fragmente zu erhalten (Abbas *et al.*, 1996).

Weitere Antikörpervarianten können mit Hilfe gentechnischer Methoden rekombinant hergestellt werden. Die kleinste Antigen-bindende Einheit ist das Fv-Fragment. Es enthält nur die variablen Bereiche der leichten und schweren Kette. Da die Ketten des Fv-Fragments nicht durch intermolekulare Disulfidbrücken zusammengehalten werden, ist die Stabilität eines Fv verglichen mit einem Fab-Fragment stark reduziert. Eine Stabilisierung lässt sich durch die Verknüpfung von V_H und V_L mit einem Peptid-Linker erzielen (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Für die korrekte Zusammenlagerung beider Domänen werden in der Regel Linker-Peptide mit 15-20 hydrophilen Aminosäuren verwendet, um die Entfernung von ca. 3,2 - 4,3 nm zwischen dem C-Terminus von V_H und dem N-Terminus von V_L zu überbrücken (Filpula & McGuire, 1999). Die Anordnung V_H-Linker-V_L ist gegenüber der ebenfalls möglichen, umgekehrten Anordnung der variablen Domänen räumlich begünstigt (Schmiedl & Dübel, 2004). Diese Fragmente sind kleiner (≈25-30 kDa) als Fab-Fragmente und werden als scFv-Fragmente (*single chain Fragment*

variable) bezeichnet, da die beiden V-Domänen beider Ketten auf einer Polypeptidkette lokalisiert sind. Die räumliche Nähe der V-Domänen erleichtert die intramolekulare Anlagerung und Assoziation der Domänen zu einem funktionellen scFv-Fragment. Ein Nachteil des scFv-Formats besteht darin, dass sich bei hohen Proteinkonzentrationen Dimer- und Aggregatstrukturen ausbilden können (Wörn & Plückthun, 2001).

Fab-Fragmente werden heute kaum noch durch proteolytische Spaltung von IgGs gewonnen. Sie werden, ebenso wie scFv-Fragmente, rekombinant in prokaryotischen (z. B. *E. coli*) oder eukaryotischen Expressionssystemen hergestellt (Schirrmann *et al.*, 2008). Hierfür werden die Antikörperfragmente mit geeigneten Signalpeptiden (z. B. PelB) fusioniert, die eine Sekretion der Proteine in das Periplasma von Gram⁻ Bakterien ermöglichen (Skerra & Plückthun, 1988). Die Antikörperfragmente können im oxidierenden Milieu des Periplasmas intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden und ihre korrekte Faltung einnehmen. Darüber hinaus erlauben Thioreduktase-defiziente Bakterienstämme (z. B. *E. coli* Origami B) die cytoplasmatische Herstellung von Antikörperfragmenten, da sie ein oxidatives Milieu im Cytoplasma besitzen. Produzierte Antikörperfragmente können anschließend aus den Zellen in mehrstufigen Prozessen aufgereinigt werden. Die funktionelle Produzierbarkeit von Antikörperfragmenten in Mikroorganismen stellt einen großen Vorteil dar, denn dies erlaubt eine einfache Kultivierung und vermeidet die kostenintensive Produktion mit tierischen Zellkulturen.

2.2 Antikörper Phagen-Display-Technologie

Neben der klassischen Immunisierung von Versuchstieren (von Behring & Kitasato, 1890) und der Gewinnung monoklonaler Antikörper mittels der Hybridoma-Technologie (Köhler & Milstein, 1975) stellt die Antikörper Phagen-Display-Technologie ein weiteres Werkzeug zur Herstellung von Antikörpern zu Verfügung. Sie ahmt dabei ein essentielles Funktionsprinzip der B-Lymphozyten des Immunsystems nach, nämlich die Kopplung von Geno- und Phänotyp in einem Partikel (Smith, 1985) und die klonale Selektion von Bindern. Dies erlaubt die Selektion und Amplifikation spezifischer Antikörper(fragmente) aus einem riesigen Repertoire. Als besonders effizientes und robustes System hat sich dabei die Verwendung von filamentösen Bakteriophagen erwiesen.

2.2.1 Bakteriophage M13

Bakteriophagen (kurz Phagen) wurden 1917 erstmals beschrieben (d'Hérelle, 1917) und sind Viren, deren Wirtsspektrum sich ausschließlich auf Bakterien beschränkt. Die filamentösen Phagen M13, f1 und fd gehören zur Familie der *Inoviridae* (Klasse Ff), deren Virusgenom aus einzelsträngiger, zirkulärer DNA besteht. Diese Phagen töten die Wirtszelle bei der Freisetzung neuer Phagenpartikel nicht, sondern verlangsamen lediglich das Wachstum um $\approx 50\%$ (Webster, 2001).

Jede infizierte Wirtszelle setzt dabei pro Zellzyklus bis zu 200 Phagenpartikel frei. Die Phagenpartikel haben eine filamentöse Struktur (600-700 nm lang, ≈ 7 nm breit) und sind robust gegenüber Trypsinverdau und erhöhter Temperatur (Breitling & Dübel, 1997).

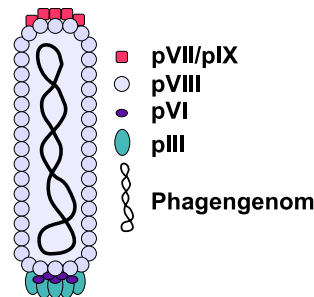


Abb. 2.2: M13 Phage - schematische Darstellung

Der M13-Phage besitzt 11 Gene, von denen drei für die Replikation, drei für den Zusammenbau der Phagenpartikel und fünf für die Hüllproteine verantwortlich sind. Das Protein pVIII ist der Hauptbestandteil der Virushülle und bildet aus ≈ 2700 Kopien des Proteins die tubuläre Struktur der Hülle (vgl. Abb. 2.2). Das Hüllprotein pIII ist verantwortlich für die Bindung der Partikel an die F-Pili des Wirts (*E. coli*) und liegt am Kopfende des Partikels in drei- bis fünffacher Kopie vor (Webster, 2001). Da die Infektion der Wirtszellen über F-Pili erfolgt, werden ausschließlich Zellen infiziert, die ein F'-Plasmid oder ein F'-Episom tragen.

2.2.2 Antikörper Phagen-Display

Das zentrale Prinzip des Phagen-Displays besteht aus der Möglichkeit, auf der Oberfläche eines Phagenpartikels ein phagenfremdes Peptid bzw. Protein zu präsentieren, während die genetische Information für das präsentierte Molekül im Phagenpartikel selbst enthalten ist. Nach einem Selektionsprozess kann durch die Infektion von *E. coli*-Zellen mit den Phagen die genetische Information des präsentierte Moleküls erhalten bleiben.

Zuerst wurde die Fusion von Peptiden mit Hüllproteinen pIII der Phagen entwickelt (Smith, 1985). Wenig später konnten auch Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Phagen präsentiert werden (McCafferty *et al.*, 1990; Breitling *et al.*, 1991). Neben scFv-Fragmenten können auch andere Antikörperformate (z. B. Fab-Fragmente) auf Phagen präsentiert werden (Hoogenboom *et al.*, 1991). Das Capsidprotein pIII erwies sich unter den Hüllproteinen als geeignetster Fusionspartner für die Präsentation von Fremdproteinen auf der Phagenoberfläche (vgl. Abb. 2.3).

Da die Integration eines Antikörpergens (z. B. scFv-Gen) in das Phagen-genom einen bedeutenden Selektionsnachteil für den entsprechenden Phagenpartikel darstellt, wurden Phagemid-Systeme entwickelt, die diesen Effekt abmildern (Breitling *et al.*, 1991; Barbas *et al.*, 1991; Hoogenboom

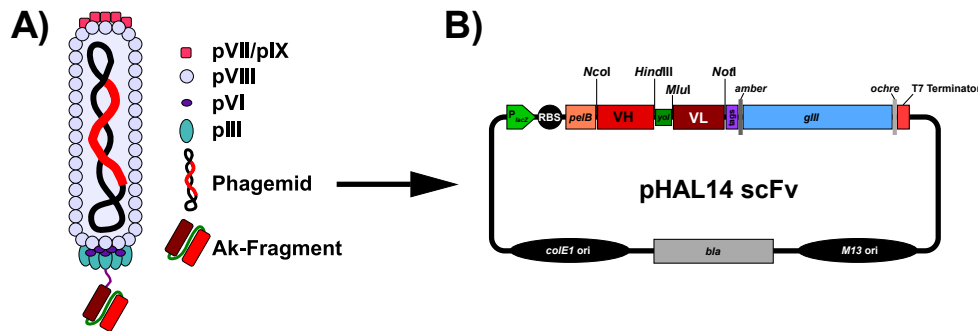


Abb. 2.3: M13 Antikörperphage + Phagemid - schematische Dartellung

A) Antikörperphage **B)** Phagemid pHAL14 scFv

et al., 1991). Phagemide (auch Phagen-Display Vektoren genannt) bestehen aus einem Plasmid, das das Verpackungssignal für den korrespondierenden filamentösen Phagen enthält (vgl. Abb. 2.3). Bei Anwesenheit eines Helferphagen, der die Komponenten für die Phagenreplikation bereit stellt, wird das Phagemid (als einzelsträngiges DNA-Fragment) während der Assemblierung der Phagenpartikel in diese verpackt und das Antikörperfragment-pIII-Fusionsprotein in die Phagenhülle eingebaut. Durch die Verwendung von modifizierten Verpackungssignalen auf dem Phagemid wird es mit deutlich höherer Effizienz in die Partikel verpackt als das Phagengenom des Helferphagen (Vieira & Messing, 1987). Die korrekte Faltung von Antikörperfragmenten kann nur im nicht-reduzierenden Milieu des Periplasmas von *E. coli* erfolgen, daher wird das Antikörperfragment-pIII-Fusionsprotein mittels eines geeigneten Signalpeptids ins Periplasma sekretiert. Der Einbau des nativen pIII-Hüllproteins in den Phagenpartikel erfolgt ebenfalls in diesem Zellkompartiment. Da das Wildtyp-pIII bevorzugt in die Partikel eingebaut wird, trägt nicht jeder Phage ein scFv-pIII Fusionsprotein, was in einer statistisch monovalenten Präsentation des Antikörperfragments auf der Phagenoberfläche resultiert (Chasteen *et al.*, 2006). Durch den Einsatz modifizierter Helferphagen (z. B. Hyperphage) kann die Präsentation mittels multivalenten Displays verbessert werden (Rondot *et al.*, 2001; Soltes *et al.*, 2007).

Die Expression des Fusionsproteins ist im Phagemid-System durch einen induzierbaren Promotor (P_{lacZ}) steuerbar und reduziert den Selektionsdruck, da keine konstitutive Expression von Antikörperfragment-pIII erfolgt, welches auf die Wirtszellen toxisch wirken kann. Dies ist insbesondere bei der Erzeugung von Antikörpergenbibliotheken (vgl. Abschnitt 2.2.3) vorteilhaft, da so die Entstehung und Anreicherung von *non-sense*-Mutanten reduziert wird (Breitling & Dübel, 1997).

2.2.3 Antikörpergenbibliotheken

Für die Herstellung von Antikörpergenbibliotheken wird die genetische Information einer Vielzahl verschiedener Antikörper aus isolierten B-Lymphozyten eines oder mehrerer Spenderorganismen mittels PCR gewonnen, in ein geeignetes Phagemid-System kloniert und anschließend in *E. coli* transformiert (vgl. Abb. 2.4). Die Bibliothek liegt nach der Transformation in *E. coli* vor

und wird nach der Verpackung der Phagemide mit einem Helferphagen in Form von Antikörperphagen nutzbar.

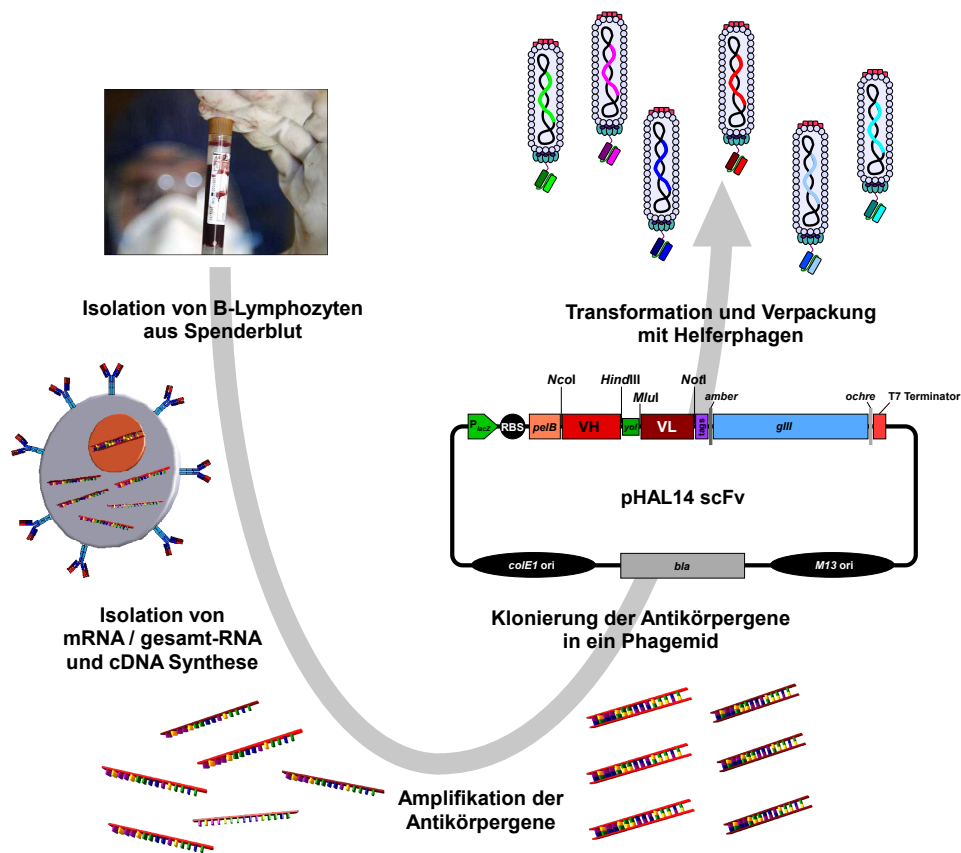


Abb. 2.4: Herstellung von Antikörpergenbibliotheken - schematische Darstellung

Die Verwendung von Phagemiden als „Träger“ für die Vielfalt der Antikörpergene bietet den Vorteil einer deutlich höheren Transformationseffizienz verglichen mit dem M13-Phagen genom (Breitling *et al.*, 1991; Barbas *et al.*, 1991). Bei der Bibliothekenherstellung stellt der Transformationsschritt den Engpass bezüglich der Komplexität dar und führt dazu, dass zusammen mit den in Abschnitt 2.2.2 angeführten Nachteilen heutzutage nahezu ausschließlich Phagemidsysteme für die Erzeugung Phagen-Display-basierter Antikörpergenbibliotheken zum Einsatz kommen. Es wurden so Antikörpergenbibliotheken mit einer theoretischen Komplexität von bis zu 10^{10} Einzelklonen (de Haard *et al.*, 1999) erzeugt. Eine theoretische Komplexität von 10^{11} Einzelklonen kann mit Hilfe spezieller Rekombinationssysteme erreicht werden (Sblattero & Bradbury, 2000).

Das für die Erzeugung der Antikörpergenbibliothek verwendete Genrepertoire und der Spenderorganismus erlaubt eine Unterscheidung in universelle Bibliotheken und Immunbibliotheken (Hust *et al.*, 2007a). Letztere werden mit Hilfe immunisierter Spenderorganismen hergestellt. Im Spender ist bereits eine primäre und sekundäre Immunantwort gegen das verwendete Antigen erfolgt und es liegen affinitätsgereifte IgG-Antikörper vor. Nach Isolierung von B-Lymphozyten

werden die Genfragmente der V-Regionen mit IgG-spezifischen Primersets amplifiziert, und die Bibliothek wird erzeugt (Clackson *et al.*, 1991). Immunbibliotheken erlauben die Generierung von hochaffinen Antikörperfragmenten. Die Anreicherung von Bindern gegen Antigene, die nicht für die Immunisierung verwendet wurden, ist jedoch stark eingeschränkt.

Universelle Bibliotheken umgehen dieses Problem, hier wird das IgM-Genrepertoire aus B-Lymphozyten nicht immunisierter Spender amplifiziert. Da IgM an der primären Immunantwort beteiligt ist und eine große Komplexität der Antikörpergene vorliegt, können aus universellen Bibliotheken Antikörper gegen nahezu beliebige Antigene isoliert werden (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993). Universelle Bibliotheken lassen sich in naive, semi-synthetische und synthetische Bibliotheken unterscheiden. Naive Bibliotheken enthalten die Gene der Antikörperfragmente aus den Spendern in unveränderter Form. Lediglich die Kombination aus V_H und V_L ist zufällig. Semi-synthetisch bedeutet, dass bestimmte Bereiche der verwendeten Antikörpergene artifizielle Sequenzen enthalten, z. B. eine randomisierte CDR-H3 Region (Hoogenboom & Winter, 1992). Bei synthetischen Bibliotheken werden vollständig randomisierte CDR-Bereiche mit definierten *Framework*-Regionen kombiniert und es wird so eine hohe Komplexität erreicht (Knappik *et al.*, 2000).

Antikörpergenbibliotheken lassen sich prinzipiell aus allen Gnathostomata herstellen, Voraussetzung ist jedoch die Kenntnis der DNA-Sequenz der zu amplifizierenden Antikörpergenfamilie. Derzeit machen Antikörpergenbibliotheken humanen Ursprungs den Großteil der verwendeten Bibliotheken aus.

2.2.4 Selektion spezifischer Antikörperphagen (Panning)

Die Phagen-Display-Technologie ist ein sehr effizientes Selektionssystem zum Screening von komplexen Antikörpergenbibliotheken. Bis zu 10^{14} Phagenpartikel können in einem mL Suspension konzentriert und auf Bindung an ein Zielmolekül untersucht werden. Die Sensitivität des Selektionssystems ist so hoch, dass aus 10^{10} verschiedenen Partikeln ein spezifisch bindender Antikörperphage selektiert und angereichert werden kann. Dieses Selektionsverfahren wird in Anlehnung an die Goldwäscher auch Panning genannt (Parmley & Smith, 1988).

Hierbei wird zunächst das Zielprotein, gegen das Antikörperfragmente isoliert werden sollen, an eine feste Phase gebunden. Die Immobilisierung kann in Mikrotiterplatten (Barbas *et al.*, 1991), in Immunoröhrchen (Hust *et al.*, 2002) oder an magnetischen *Beads* (Hawkins *et al.*, 1992) stattfinden. Eine Antikörperphagen-Bibliothek wird mit dem Antigen inkubiert und nicht bindende Antikörperphagen werden in mehreren Waschschritten entfernt (vgl. Abb. 2.5). Die gebundenen Antikörperphagen werden durch eine pH-Verschiebung oder durch Trypsin eluiert und für eine Infektion frischer *E. coli*-Zellen benutzt. Durch Zugabe von Helferphagen zu den infizierten Zellen können die eluierten Antikörperphagen amplifiziert und anschließend für eine weitere Selektionsrunde verwendet werden. Durch 2-5 malige Wiederholung der „Panning-Runde“ können spezifisch bindende Antikörperphagen selektiert und angereichert werden. Eine gewünschte An-

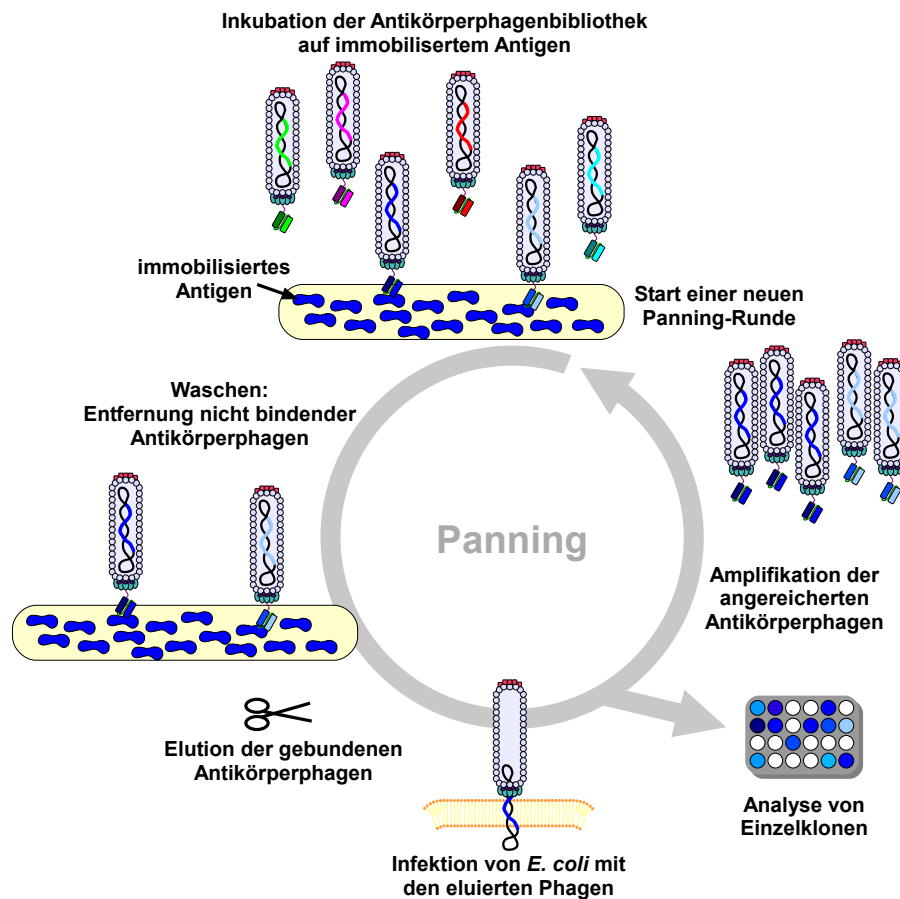


Abb. 2.5: Ablauf der Selektion spezifischer Antikörperphagen (Panning) - schematische Darstellung

zahl an Einzelklonen kann anschließend auf die Produktion geeigneter Antikörperfragmente hin untersucht werden.

2.3 Affinität und Avidität

Die Affinität ist ein Maß für die Bindungsstärke einer Bindung zwischen zwei Bindungspartnern bei nicht-kovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Bindungen dieses Typs unterliegen dem Massenwirkungsgesetz und können anhand folgender Formel beschrieben werden:



A =Antikörper, B =Antigen, AB =Antikörper-Antigenkomplex k_a =Assoziationsrate, k_d =Dissoziationsrate

Mischt man einen Antikörper mit seinem Antigen, bilden sich Antikörper-Antigen Komplexe, wobei die Komplexe spontan wieder dissoziieren können.

Liegt das Antigen in großem Überschuss vor, wird der Anteil der Antikörper, die im Gleichgewichtszustand an das Antigen gebunden haben, durch die Konzentration des Antigens und die Bindungsstärke der Wechselwirkung bestimmt. Unter diesen Bindungen ist die Antigenkonzentration, bei der 50 % der Antikörper an das Antigen gebunden vorliegen und sich 50 % der Antikörper frei in Lösung befinden, ein Maß für die Bindungsstärke. Diese Konzentration des Antigens wird als Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) definiert und molar [M] angegeben (Abbas *et al.*, 1996). Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (oft auch als Dissoziationskonstante bezeichnet) wird anhand der Formel (2.2) beschrieben.

$$K_D = \frac{c(A) \cdot c(B)}{c(AB)} = \frac{k_d}{k_a} \quad (2.2)$$

K_D =Gleichgewichtsdissoziationskonstante, c =Konzentration, A =Antikörper, B =Antigen, AB =Antikörper-Antigenkomplex, k_a =Assoziationsrate, k_d =Dissoziationsrate

Für k_a findet sich auch die Bezeichnung k_{on} (*On-rate*) und für k_d die Bezeichnung k_{off} (*Off-rate*).

Ein niedriger K_D -Wert repräsentiert demnach eine höhere Affinität. Die Bestimmung von K_D -Werten kann durch Gleichgewichtsdialyse, ELISA-Verfahren (Friguet *et al.*, 1985) oder durch experimentelle Erfassung von k_a und k_d mittels Oberflächenplasmonresonanz (Karlsson *et al.*, 1993; Hefta *et al.*, 1996) erfolgen.

Die Avidität ist definiert als die Gesamtbindungsstärke eines Moleküls in nicht-kovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen und wird oftmals auch als apparente oder funktionelle Affinität bezeichnet (Karush, 1970). Die Avidität hängt von der Valenz und den Affinitäten der beteiligten Bindungen ab (Schlee & Kleber, 1991). Besitzt ein Antikörper mehr als ein Paratop (z. B. besitzt IgG zwei Antigen-Bindestellen und IgM bis zu zehn Antigen-Bindestellen) und lässt das Antigen bzw. dessen sterische Anordnung mehrere Bindungen zu, so erhöht sich die Gesamtbindungsstärke des Antikörpers an das Antigen deutlich. Daraus resultiert, dass niedrig-affine Antikörper durch Multimerisierung eine hoch-avide und damit starke Interaktion mit dem Antigen eingehen können. Die Stärke des Aviditätseffekts nimmt mathematisch betrachtet nicht additiv zu (Abbas *et al.*, 1996). Genaue Vorhersagen bezüglich der Stärke des Aviditätseffekts sind daher nicht trivial und hängen von der Orientierung und Dichte des Antigens und der Orientierung der Bindestellen des Antikörpers ab (Müller *et al.*, 1998b).

2.4 Affinitätsreifung von Antikörpern

2.4.1 Affinitätsreifung *in vivo*

Die Affinitätsreifung von Antikörpern ist ein Teil des adaptiven Immunsystems und hilft, die Effizienz der Immunantwort zu verbessern. Bei einer Infektion des Organismus mit einer Fremdsubstanz (z. B. Toxin, Mikroorganismus) erfolgt zunächst eine primäre Immunreaktion. Dabei

binden aus dem hochdiversen Repertoire der zirkulierenden IgM-präsentierenden B-Lymphozyten ($>10^8$ verschiedene Antikörperspezifitäten) zunächst nur wenige B-Lymphozyten spezifisch an das Antigen. Durch die Bindung an das Antigen erhalten die Zellen einen stimulativen Impuls zur Vermehrung und der Anteil der Antigen-spezifischen B-Lymphozyten erhöht sich deutlich. Der Hauptteil der aktivierten B-Lymphozyten differenziert sich anschließend zu Plasmazellen und es kann ein Isotypenwechsel der gebildeten Antikörper erfolgen. Anstatt der IgM-Antikörper werden verstärkt IgG-Antikörper gebildet und von den Zellen ins Blut sezerniert (Abbas *et al.*, 1996; Breitling & Dübel, 1997; Janeway *et al.*, 2002). Einige B-Lymphozyten differenzieren sich nach dem Antigen-Stimulus nicht zu Plasmazellen, sondern wandern in die Keimzentren der Lymphknoten. Dort vermehren sich diese Zellen und es findet eine somatische Hypermutation statt. Dabei unterliegen die Abschnitte der für die Fv-Regionen kodierenden Gene einer extrem hohen Mutationsrate, die $\approx 10^4$ mal höher liegt als für die übrigen Genbereiche (Abbas *et al.*, 2007). Es entsteht eine Vielzahl neuer Antikörpervarianten, von denen einige deutlich verbesserte Bindungseigenschaften aufweisen. Die in den Keimzentren vorliegenden, mutierten B-Lymphozyten benötigen für ihr Überleben einen Stimulus durch die Bindung ihrer membrangebundenen Antikörper an das von follikulären dendritischen Zellen präsentierte Antigen (Abbas *et al.*, 1996; Pezzutto *et al.*, 2006). Erfolgt dieser Stimulus nicht, vollziehen die Zellen Apoptose und sterben ab. Die mutierten B-Lymphozyten konkurrieren bei der Bindung an das Antigen sowohl untereinander, als auch mit dem von den Plasmazellen gebildeten Überschuss an IgG-Antikörpern. Durch die starke Konkurrenz um die Antigenbindung in den Keimzentren werden die mutierten B-Lymphozyten, deren präsentierter Antikörper eine verbesserte Affinität zum Antigen aufweist, klonal selektiert. Nach dieser Selektion differenzieren die überlebenden B-Lymphozyten zu Gedächtniszellen, die die genetische Information für die affinitätsgereiften Antikörper dauerhaft verfügbar halten. Bei erneutem Kontakt mit dem betreffenden Antigen werden die Gedächtniszellen umgehend aktiviert und stellen in kurzer Zeit, d. h. in wenigen Stunden, affinitätsgereifte Antikörper zur Verfügung (Abbas *et al.*, 1996; Breitling & Dübel, 1997; Janeway *et al.*, 2002). Dieser Mechanismus verhindert eine neuerliche Infektion und bildet die Grundlage für die Impfstherapie.

2.4.2 Affinitätsreifung *in vitro*

Immunbibliotheken enthalten bereits affinitätsgereifte Antikörperfragmente aus dem Spenderorganismus. Dadurch können direkt hochaffine Antikörpern gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen gewonnen werden. Universelle, IgM-basierte, naive Antikörpergenbibliotheken liefern im direkten Vergleich mit Immunbibliotheken oftmals Antikörperfragmente mit geringerer Affinität zum Antigen. Je nach beabsichtigter Verwendung reicht die Affinität der Antikörperfragmente nicht aus, weshalb eine *in vitro*-Affinitätsreifung erforderlich sein kann. Hierbei wird der natürliche Prozess mit verschiedenen Schritten nachgeahmt.

Zunächst werden die betreffenden Antikörperfragmentgene verändert, um die Antigenbindungseigenschaften des Antikörperfragments zu variieren. In einem zweiten Schritt werden dann die

höher affinen Binder selektiert (Roskos *et al.*, 2007). In der Praxis kann dies auf verschiedenen Wegen erreicht werden.

Genetische Varianten des Antikörperfragments können durch ein *Chain-shuffling* erzeugt werden. Hierbei wird das korrespondierende Antikörperfragmentgen einer der beiden Ketten des Antikörperfragments im Phagemid durch ein Bibliotheks-Genrepertoire der gleichen Kettenklasse ersetzt (Marks *et al.*, 1992; Park *et al.*, 2000). Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von *E. coli*-Mutatorstämmen zur Erzeugung von Zufallsmutationen im gesamten Phagemid (Low *et al.*, 1996; Irving *et al.*, 1996; Coia *et al.*, 2001; Nguyen & Daugherty, 2003). Die erzeugten Mutationen sind ungerichtet und können sowohl das Phagemid als auch das Wirtsgenom betreffen. Unerwünschte Mutationen in essentiellen Genabschnitten müssen dabei durch eine stringente Selektion vermieden werden. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass bei Verwendung spezieller Mutatorstämmen (z. B. *E. coli mutD5* FIT) keine Transformation der Phagemide erforderlich ist und direkt Antikörperphagen produziert werden können. Pro Amplifikationszyklus liegt die Mutationsrate bei $\approx 0,3$ Punktmutationen pro 1000 bp (Coia *et al.*, 2001).

Andere Methoden zur Erzeugung von Mutationen sind die chemische Mutagenese und der Einsatz von ionisierender β -Strahlung. Die Nachteile dieser Methoden sind mit denen von Mutatorstämmen vergleichbar, da das gesamte Wirtsgenom und das Phagemid der Mutagenese ausgesetzt sind.

Eine weitere Methode zur Erzeugung von Zufallsmutationen im gesamten Phagemid ist die *Error-prone rolling circle* DNA-Amplifikation. Die DNA-Polymerase des *Bacillus subtilis* spezifischen Phagen $\Phi 29$ ist in der Lage, zirkuläre DNA direkt zu amplifizieren (Dean *et al.*, 2001). Durch Zugabe von $MnCl_2$ kann die Fehlerrate der Polymerase deutlich erhöht werden (max. 3,5 Punktmutationen pro 1000 bp und Amplifikationszyklus (Fujii *et al.*, 2004)). Bei dieser Mutationsmethode können ebenfalls nicht erwünschte Mutationen in essentiellen Bereichen entstehen, da das gesamte Phagemid der Mutagenese unterworfen wird.

Die *Error-prone*-PCR erlaubt die zufällige Mutation ausschließlich des Antikörperfragmentgens. Dabei wird die Fehleranfälligkeit der DNA-Polymerase durch Variation der PCR-Pufferbedingungen (Johnson & Hawkins, 1996; Daugherty *et al.*, 2000; Martineau, 2002; Cirino *et al.*, 2003), z. B. durch $MnCl_2$ -Zugabe (Fromant *et al.*, 1995), der Verwendung von Nukleotid-Analoga (Zaccolo & Gherardi, 1999) oder durch den Einsatz spezieller Mutationspolymerasen künstlich erhöht. Durch sequenzielle *Error-prone*-PCRs konnten Mutationsraten von bis zu 50 Punktmutationen pro 1000 bp erzielt werden (Graff *et al.*, 2004). Mit spezifischen Primersets wird die Mutagenese auf das amplifizierte Antikörpergen beschränkt und hat keine Mutationen in anderen Bereichen des Phagemids bzw. des Wirtsgenoms zur Folge. Die Mutationsverteilung kann durch eine „sexuelle“ PCR (*DNA shuffling*) nochmals erhöht werden (Stemmer, 1994a,b; Fermér *et al.*, 2004). Nachteil aller PCR-Methoden ist, dass eine neue Klonierung der PCR-Produkte nötig ist und somit die Komplexität der erzeugten Bibliotheken durch den Transformationsschritt begrenzt wird.

Der mutagenisierte Genabschnitt des Antikörperfragments kann auch nur einzelne CDR-Bereiche betreffen. Hier wird die Randomisierung mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotid-Primern er-

reicht (Schier & Marks, 1996; Chowdhury & Pastan, 1999). Noch einen Schritt weiter geht die *Hotspot*-Randomisierung, der zunächst die bioinformatische Analyse des Antikörperfragmentgens vorausgeht. Anhand der Daten können *Hotspot*-Codons ermittelt werden, die einer verstärkten natürlichen Mutation unterliegen. Diese Codons werden dann mit Hilfe PCR-basierter Methoden gezielt mutiert (Yau *et al.*, 2005).

Nachdem eine ausreichende Zahl an Mutationen im Ausgangsantikörpergen eingebracht wurde und die Antikörpergenbibliotheken mit den mutierten Antikörpergenen angelegt sind, müssen durch geeignete Selektionsmethoden Antikörperphagen mit verbesserter Affinität selektiert werden. Durch die Konkurrenz der Antikörperphagen um die Bindung an das Antigen werden zum einen Varianten mit höherer Affinität zum Antigen angereichert und zum anderen reichern sich Antikörperphagen an, die besser produziert werden können. Eine Selektionsmethode basiert auf der „üblichen“ Panning-Methode (Clackson *et al.*, 1991; Marks *et al.*, 1992; Hust *et al.*, 2007b). Nach Immobilisierung geringer Mengen (<10 ng) des Antigens an eine feste Phase (z. B. Polystyrol) wird die Antikörperphagenbibliothek inkubiert. Durch stringente Waschbedingungen (große Puffervolumina, wochenlange Waschschrte) kann die Anreicherung affinitätsgereifter Antikörperfragmente erreicht werden (Thie *et al.*, 2008). Da es bei der Immobilisierung des Antigens zu Bereichen mit hoher Antigendichte kommen kann, besteht bei dieser Form der Selektion die Möglichkeit, Varianten mit hoher Affinität oder einer starken Tendenz zur Multimerbildung (Avidität) anzureichern (Johnson & Hawkins, 1996; Schier *et al.*, 1996).

Diesem möglichen Problem kann durch eine Selektion in Lösung begegnet werden (Hawkins *et al.*, 1992). Biotinyliertes Antigen wird in geringen Mengen zusammen mit der Antikörperphagenbibliothek inkubiert. Liegt die Konzentration des Antigens unterhalb der Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) des Ausgangsantikörpers, binden bevorzugt Antikörperphagen mit erhöhter Affinität an das Antigen. Durch einen Fangschritt mit Streptavidin-*Beads* können die an das biotinylierte Antigen gebundenen Antikörperphagen abgetrennt werden (Schier *et al.*, 1996).

Die Selektion in Lösung kann durch Zugabe eines Kompetitors dazu eingesetzt werden, explizit Antikörperphagen mit einer niedrigen Dissoziationskonstante anzureichern (Johnson & Hawkins, 1996). Nach der Bindung von Antikörperphagen wird entweder ein molarer Überschuss (bis 1000fach (Thie *et al.*, 2008)) an unbiotinyliertem Antigen oder löslichem Antikörperfragment zugegeben. Nachdem sich ein Bindungsgleichgewicht in der Lösung eingestellt hat, was mehrere Tagen dauern kann, können durch einen Fangschritt mit Streptavidin-*Beads* an das biotinylierte Antigen gebundene Antikörperphagen isoliert werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Selektion affinitätsgereifter Antikörperphagen ist die „kontinuierlicher-Fluss“-Methode. Hierbei wird das Antigen an eine feste Phase gekoppelt, die im Normalfall für SPR-Analysen verwendet wird (Biacore-Chip). Im SPR-Gerät werden nun die Antikörperphagen einer Affinitätsbibliothek über das Antigen geleitet. Nach der „Beladung“ wird ein kontinuierlicher Pufferstrom für mehrere Stunden durch die Messzelle geleitet. Antikörperphagen mit geringer Affinität dissoziieren in dieser Zeit vom Antigen und werden direkt durch den Pufferstrom weggewaschen. Anschließend werden die noch gebundenen Antikörperphagen (mit niedriger Dissoziationskonstante) eluiert (Malmberg *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2006).

2.5 Multimerisierung von Antikörperfragmenten

Die Multimerisierung von Antikörperfragmenten ermöglicht eine Verbesserung der Bindungseigenschaften durch Nutzung des Aviditätseffekts (vgl. Abschnitt 2.3). Native Antikörperformate weisen immer mindestens zwei Bindungsstellen auf und nutzen den Aviditätseffekt standardmäßig. Um diesen Effekt auch bei artifiziellen Antikörperformaten (scFv, Fab) zu nutzen, wurde eine Reihe von Verfahren zur Herstellung von multimeren Antikörperfragmenten entwickelt (Plückthun & Pack, 1997).

Der erste Ansatz versucht durch Modifikation der Fv-Domänen und/oder der Linker-Peptide eine di- oder multimeren Zusammenlagerung der Fv-Domänen zu erreichen. Klassisches Beispiel ist hier der *Diabody*. Durch Reduktion der Linkerlänge eines scFv können die beiden Fv-Domänen keine funktionelle Konformation einnehmen. Durch Anlagerung eines zweiten „aufgeklappten scFv“ entsteht ein funktioneller, bivalenter *Diabody* (Holliger *et al.*, 1993). Weitere Beispiele aus dieser Klasse sind *Triabodies* (Iliades *et al.*, 1997), *Tetrabodies* (Gall *et al.*, 1999; Hudson & Kortt, 1999; Kortt *et al.*, 2001), Tandem-Antikörper (Gruber *et al.*, 1994; Kurucz *et al.*, 1995; Kipriyanov *et al.*, 1999) und über intermolekulare Disulfidbrücken verbundene scFv (Kipriyanov *et al.*, 1994; Schmiedl *et al.*, 2000a; Albrecht *et al.*, 2004).

Der zweite Ansatz zur Erzeugung von Multimeren basiert auf Fusionen zwischen Antikörperfragmenten und konstanten Domänen von Immunglobulinen. Hier sind diverse Konfigurationen möglich (Dübel & Kontermann, 2001), am häufigsten finden sich jedoch *Minibodies* und scFv-Fc-Fusionen. Bei *Minibodies* ist ein scFv-Fragment N-terminal an die C_H3 Domäne eines IgGs fusioniert. Diese Domäne ermöglicht die Dimerisierung durch Bindung an eine weitere C_H3 Domäne (Hu *et al.*, 1996). Die scFv-Fc-Fusion stellt einen IgG ähnlichen Aufbau dar. Ein scFv-Fragment ist über eine *Hinge*-Region mit dem N-Terminus eines IgG-Fc-Teils verbunden. Im Vergleich mit einem IgG-Antikörper fehlen die Domänen C_L und C_H1 (Shu *et al.*, 1993). Oftmals werden Multimerisierungsstrategien der ersten beiden Ansätze miteinander kombiniert.

Eine weitere Möglichkeit Antikörperfragmente zu multimerisieren ist die Fusion mit heterologen Peptiden oder Proteinen, die eine Multimerisierung vermitteln. Im Regelfall sind die Fusionspartner am C-Terminus des Antikörperfragments angefügt. Als mögliche Fusionspartner sind unter anderem beschrieben: Alkalische Phosphatase (Dimerisierung) (Carrier *et al.*, 1995), Streptavidin (Tetramerisierung) (Dübel *et al.*, 1995), Barnase/Bastar (Di-, Trimerisierung) (Deyev *et al.*, 2003), Calmodulin/*calmodulin binding peptide* (Dimerisierung) (Neri *et al.*, 1995), Leucin-*Zipper* (Di-, Tetramerisierung) (Kostelny *et al.*, 1992; de Kruif & Logtenberg, 1996; Plückthun & Pack, 1997), amphipatische Helices (Dimerisierung) (Pack & Plückthun, 1992; Müller *et al.*, 1998a), die Oligomerisierungsdomäne von p53 (Tetramerisierung) (Rheinhecker *et al.*, 1996), RNase (S-Protein/S-Peptid) (Dimerisierung) (Dübel, 1999) und die Assemblierung von tetrameren *Streptabodies* durch die Biotinylierung von Antikörperfragmenten und deren Bindung an Streptavidin (Cloutier *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurden Antikörperfragmente mit Hilfe von Leucin-*Zippern*, amphipatischen Helices, p53 und *Streptabodies* multimerisiert (vgl. Abb. 2.6).

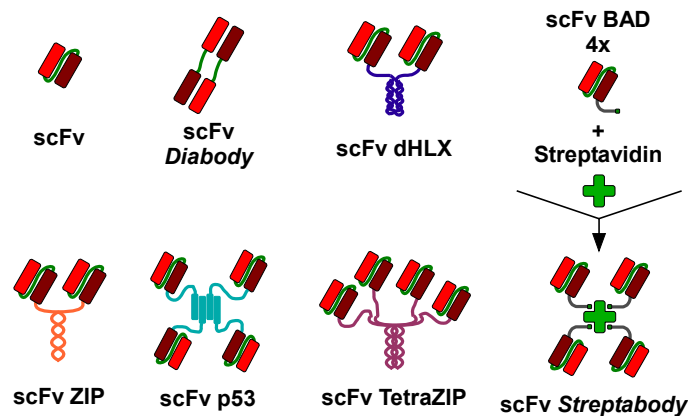


Abb. 2.6: Verwendete Multimerisierungsdomänen in Fusion mit einem scFv-Fragment - schematische Darstellung

Leucin-*Zipper* bestehen aus so genannten *coiled-coil* Strukturen und gehören zu den amphipatischen Helices. Sie treten als Dimerisierungsvermittler in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren auf. In ihrer Sequenz findet sich bevorzugt an jeder siebten Aminosäure ein Leucin, daher ihr Name. Die ZIP-Domäne entstammt dem Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4. Die TetraZIP-Domäne ist eine Modifikation der ZIP-Domäne und führt zur Tetramerisierung. Die dHLX-Domäne gehört ebenfalls zur Gruppe der amphipatischen Helices und besteht aus einem *Helix-Turn-Helix*-Motiv. Zwei dieser Motive lagern sich zu einem Vier-Helix-Bündel zusammen und führen zu einer effektiven Dimerisierung. Die Tetramerisierungsdomäne p53 stammt aus dem humanen Transkriptionsfaktor Tumorsuppressorprotein p53.

Antikörperfragmente können durch Fusion mit einer Biotin-Akzeptordomäne (BAD) (Schatz, 1993) und Koexpression einer Biotin-Ligase *in vivo* gerichtet biotinyliert werden. Durch Zugabe von Streptavidin können tetramere Antikörperkomplexe hergestellt werden.

Um die Faltung der Antikörperfragmente und die Assoziation der Multimerisierungsdomänen nicht zu beeinträchtigen, werden zur räumlichen Trennung flexible Linker-Peptide zwischen die Regionen fusioniert.

2.6 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom (Brustkrebs) ist eine bösartige (maligne) Tumorerkrankung der menschlichen Brustdrüse (Mamma). Es geht aus Epithelzellen des Drüsengewebes hervor und gehört zur Gruppe der Adenokarzinome.

2.6.1 Epidemiologie

In Deutschland erkranken im Jahr ≈ 57.000 Frauen an Brustkrebs. Dieser ist damit die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen. Brustkrebs ist für 27,8 % aller Krebserkrankungen bei weiblichen Patienten verantwortlich (Robert Koch-Institut, 2007). Männer können ebenfalls an Brustkrebs leiden, machen jedoch weniger als 1 % aller Erkrankungsfälle aus. Im Jahr 2006 starben in Deutschland ≈ 17.000 Frauen an Brustkrebs, das entspricht 4 % aller Sterblichkeitsfälle (Statistisches Bundesamt, 2007). Brustkrebs ist in Deutschland die häufigste Todesursache bei Frauen im Alter zwischen 30 und 60 Jahren. Weltweit wird die Zahl der Todesfälle laut WHO auf ≈ 500.000 geschätzt. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 63 Jahren (Robert Koch-Institut, 2007). Es erkranken schätzungsweise ≈ 10 % aller Frauen in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. In Europa und Nordamerika tritt Brustkrebs häufiger als in anderen Regionen der Erde auf (McPherson *et al.*, 2000).

2.6.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist unbekannt. Es gibt eine Reihe von Risikofaktoren, die die relative Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung beeinflussen können (vgl. Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Brustkrebs-Risikofaktoren:

Auflistung einzelner Risikofaktoren und ihr Einfluss auf das relative Risiko einer Erkrankung. Tabelle modifiziert nach Stauber & Weyerstahl (2007).

Risikofaktor	Erhöhung des relativen Risikos um den Faktor
bestehende Krebserkrankung der anderen Brust	>10
genetische Disposition (familiäre Belastung; BRCA1,2)	2 - 9
>30 Jahre bei Erstschwangerschaft	3
Adipositas (bes. postmenopausal)	2 - 3
supraphysiologische Östrogenbehandlung (postmenopausal)	1 - 3
Mastopathie	≈ 2
a) ohne Atypie	1 - 1,5
b) mit Atypie	2 - 10
Kinderlosigkeit	1,5 - 2,3
Alkoholkonsum >20 g d ⁻¹	1,5 - 2
frühe Menarche / späte Menopause	1 - 2

Weitere Risikofaktoren (ohne Angabe der Erhöhung des Risikos) sind: Alter, ionisierende Strahlung, Hyperprolaktämie, ethnische Faktoren, Rauchen (prämenopausal), fleisch- und fettreiche Ernährung.

2.6.3 Symptomatik, Diagnose, Verlauf und Therapie

Das Leitsymptom eines Mammakarzinoms ist ein schmerzloser, derber Knoten im Brust- bzw. Achselbereich. Weitere Symptome können eine sezernierende oder eine eingezogene Mamille, ein lokales Ödem, Haut- oder Formveränderungen der Brust sein. Die genannten Symptome sind Erstsymptome eines fortgeschrittenen Karzinoms. Ein Frühsymptom ist ein verdächtiger Tastbefund in der Brust (Pschyrembel, 1993).

Die Diagnose erfolgt bei Verdachtsfällen anhand bildgebender Verfahren (Mammographie, Sonographie, MRT, PET) und Gewebebiopsien. Wird ein maligner Tumor erkannt, erfolgen weitere Untersuchungen bezüglich des Status der Hormon- und HER2-Rezeptoren sowie ein *Grading* (histopathologische Differenzierung) des Tumors.

Beim Mammakarzinom unterscheidet man zudem zwischen nicht-invasiven (*in situ*) und invasiven Tumoren. Bei nicht-invasiven Tumoren befinden sich die malignen Veränderungen begrenzt in einem abgekapselten Bereich des Drüsengewebes. Der Tumor breitet sich in die Drüsenläppchen und Milchgänge, jedoch nicht in das umgebende Gewebe aus. Anders bei einem invasiven Mammakarzinom; hier durchbrechen die Tumorzellen das Drüsengewebe und können sich im Brustgewebe ansiedeln (Sainsbury *et al.*, 2000). Hat der Tumor das Drüsengewebe durchbrochen, besteht die Gefahr einer Metastasierung. Diese erfolgt lymphogen und betrifft zuerst die regionalen Lymphknoten (meist im Achselbereich). Fernmetastasen können in fortgeschrittenen Stadien die Wirbelsäule, Becken, Leber, Lunge, Pleura und Ovarien befallen (Pschyrembel, 1993).

Je nach Schwere der Erkrankung und Zustand der Patientin kann die Therapie die Heilung, die Lebenszeitverlängerung oder die Milderung der Krankheitsbeschwerden zum Ziel haben. Auf Grund differenzierter Diagnosen wird eine an die Bedürfnisse der Patientin individuell angepasste Therapie ermöglicht. Generell stehen verschiedene Therapieformen zur Verfügung, die oftmals in Kombination eingesetzt werden. Neben einer Mastektomie (Brustamputation) ist auch eine brusterhaltende Operation möglich, wenn ein günstiges Größenverhältnis zwischen Brust und Tumor besteht. Nach Operationen wird oftmals eine Strahlentherapie zur Reduktion des Rezidiv-Risikos durchgeführt. Je nach Befund ist eine adjuvante Chemotherapie mit verschiedenen Zytostatika erforderlich. Hormonabhängige Tumore werden zusätzlich mit einer Antihormontherapie behandelt, wobei der menopausale Zustand der Patientin über die Form der Therapie entscheidet.

2.6.4 Antikörper basierte Therapie

Der HER2-Rezeptor (Schechter *et al.*, 1984) kann bei 20 - 30 % aller Mammakarzinome überexprimiert nachgewiesen werden. Er gehört zur Gruppe der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren, stimuliert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose (Hudis, 2007). Beim Mammakarzinom

führt die HER2-Überexpression häufig zu einem aggressiven Krankheitsverlauf und reduziert die Heilungschancen.

Der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) bindet an die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors. Er wurde 1998 in den USA und 2000 in der EU zu Behandlung von metastasiertem Brustkrebs mit HER2-Überexpression in Verbindung mit einer adjuvanten Chemotherapie zugelassen. Der genaue Wirkmechanismus von Trastuzumab ist noch nicht eindeutig geklärt. Als mögliche Wirkmechanismen sind die Rekrutierung von Immun-Effektor-Zellen (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) und eine antiangiogenetische Wirkung in der Diskussion. Darüber hinaus wird die Hemmung der intrazellulären Signalweiterleitung der Tyrosin-Kinase-Domäne von HER2 durch Hemmung der proteolytischen Spaltung von HER2 bzw. durch Verhinderung einer HER2-Dimerisierung als weiterer Wirkmechanismus diskutiert (Hudis, 2007). Da Trastuzumab tumorspezifisch wirksam ist, treten Nebenwirkungen reduziert auf. Es wird jedoch bei bis zu 4 % aller Patientinnen eine z. T. reversible Schädigung des Herzmuskels beschrieben (Telli *et al.*, 2007).

2.7 MUC1 als Tumorantigen und potentiell Ziel einer Antikörpertherapie

Für die Immuntherapie von Adenokarzinomen (u. a. Brustkrebs) stellt das zur Gruppe der Mucine gehörende Protein MUC1 ein interessantes Zielmolekül dar. MUC1 (auch CD227, CA-15-3, PEM) ist ein stark *O*-glykosyliertes Transmembranprotein, dessen Gen auf Chromosom 1 (q21) lokalisiert ist. MUC1 findet sich auf der luminalen Oberfläche vieler sekretorischer Epithelzellen im Drüsengewebe (Zotter *et al.*, 1988; Gendler *et al.*, 1991). MUC1 hat eine molekulare Masse >400 kDa (Gendler *et al.*, 1987) und besteht aus drei Domänen. Die 69 AS umfassende C-terminale Domäne ist im Cytoplasma der Zelle lokalisiert und ist durch Interaktion mit cytoplasmatischen Proteinen und dem Aktin-Cytoskelett an Signalübertragungsprozessen beteiligt (Parry *et al.*, 1990; Spicer *et al.*, 1991; Carraway *et al.*, 2003). Es sind Interaktionen mit den signaltransduzierenden Molekülen β -Catenin (Yamamoto *et al.*, 1997), Grb2 (Pandey *et al.*, 1995) und der erbB-Familie (Schroeder *et al.*, 2001) beschrieben. Die Transmembrandomäne besteht aus 31 Aminosäuren (Gendler *et al.*, 1990). Den Großteil des MUC1-Proteins macht die extrazelluläre Domäne aus (vgl. Abb. 2.7). Sie besteht hauptsächlich aus einer sich wiederholenden, 20 Aminosäuren umfassenden Sequenz, die in Anlehnung an die korrespondierende genetische Struktur als VNTR-Bereich (*Variable Number of Tandem Repeats*) bezeichnet wird (Swallow *et al.*, 1987; Gendler *et al.*, 1988; Burchell *et al.*, 1989; Gendler *et al.*, 1990). Die extrazelluläre Domäne unterliegt einem Polymorphismus bezüglich der Anzahl ihrer VNTRs. Sie enthält zwischen 20 - 120 VNTRs, wobei am häufigsten 40 - 80 VNTRs gefunden werden (Gendler *et al.*, 1988; Siddiqui *et al.*, 1988; Gendler *et al.*, 1990; Hanisch & Müller, 2000). Die VNTR-Sequenz enthält zwei Serin- und drei Threonin-Reste an deren Hydroxylgruppen eine *O*-Glykosylierung erfolgen kann (Gendler *et al.*, 1987). Die *O*-Glykosylierungen der VNTRs machen mehr als 50 % der molekularen Masse des gesamten MUC1-Proteins aus (Gendler *et al.*, 1990).

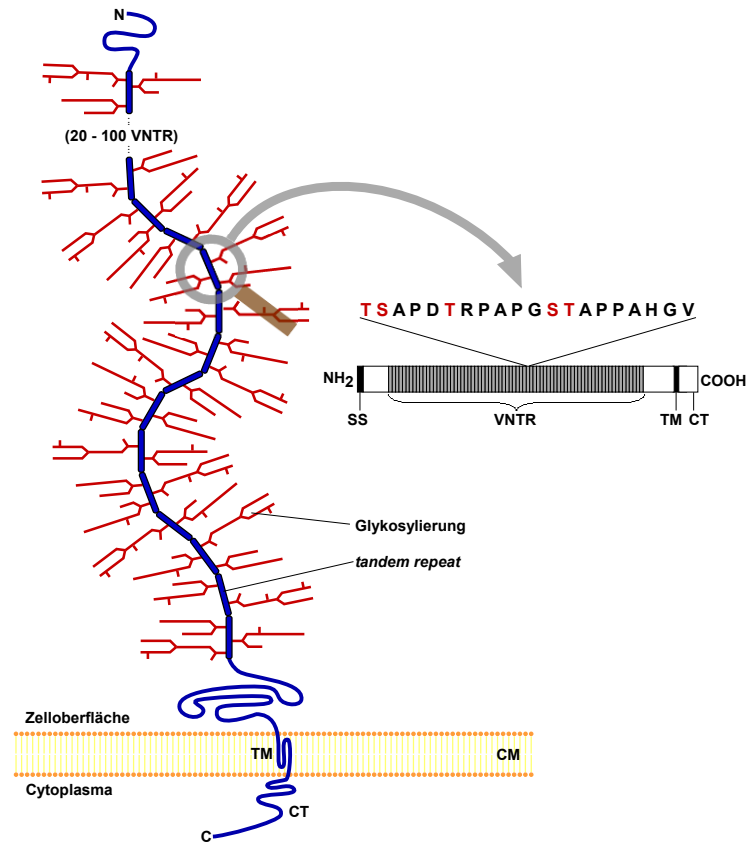


Abb. 2.7: MUC1 - schematische Darstellung

Von normalen Epithelzellen präsentiertes MUC1 ist mit langen, verzweigten Oligosaccharidketten versehen. In der exakten Aminosäuresequenz eines VNTR-Abschnitts sind mögliche O-Glykosylierungsstellen rot dargestellt. CT = cytoplasmatische Domäne von MUC1, TM = transmembrane Domäne von MUC1, CM = Cytoplasmamembran, SS = Signalsequenz.

Die O-Glykosylierungen von MUC1, welches von normalen Epithelzellen exprimiert wird, bestehen vorwiegend aus langen, verzweigten Ketten des Polylactosamin-Typs und enthalten durchschnittlich 8 - 10 Monosaccharid-Einheiten, wobei die exakte Länge variiert (Hull *et al.*, 1989; Hanisch *et al.*, 1989, 1990; Hanisch & Müller, 2000). Das hochglykosylierte MUC1 bindet Wasser und führt zu einer Befeuchtung der Zelloberflächen, die eine Austrocknung der Epithelzellen verhindert. Zudem schützt diese Schicht vor proteolytischen Angriffen auf die Zellen, verhindert die Anheftung von Mikroorganismen an die Zelloberfläche (Vimal *et al.*, 2000; Lillehoj *et al.*, 2002) und reguliert Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre-Matrix-Interaktionen (Gendler & Spicer, 1995; Lagow *et al.*, 1999).

Zwei Hauptmerkmale machen MUC1 als Tumorantigen interessant. Erstens wird MUC1 in Tumorzellen überexprimiert und auf der gesamten Zelloberfläche präsentiert und in die Blutzirkulation abgegeben (Hilkens *et al.*, 1986; Zotter *et al.*, 1988; Girling *et al.*, 1989; Safi *et al.*, 1991; Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1999). Da die apikale MUC1-Expression normaler Epithelzellen in Tumorzellen der basolateralen Expression weicht (Hollingsworth & Swanson, 2004), wird tumorassoziertes MUC1 für systemisch verabreichte Antikörper zugänglich (Danielczyk *et al.*, 2006).

Zweitens verändert sich das Muster der O-Glykosylierungen in den VNTR-Bereichen von tumorassoziiertem MUC1 (Hanisch *et al.*, 1989, 1996). Anstatt langer und verzweigter Oligosaccharidketten finden sich weniger komplexe, kürzere Zuckerketten (vgl. Abb. 2.8) (Lloyd *et al.*, 1996; Hanisch & Müller, 2000). Die apparente Glykosylierung basiert auf einer veränderten Glykosyltransferasen-Expression im Golgi-Apparat der Tumorzellen (Brockhausen *et al.*, 1995; Hanisch *et al.*, 1999; Burchell *et al.*, 1999, 2001). Darüber hinaus sind bei tumorassoziiertem MUC1 nahezu alle Glykosylierungsstellen der VNTRs mit verkürzten Oligosaccharidketten besetzt. In normalen Epithelzellen dagegen trägt MUC1 nur an $\approx 50\%$ aller potentiellen VNTR-Glykosylierungsstellen lange, verzweigte Zuckerketten (Müller *et al.*, 1997, 1999) (vgl. Abb. 2.8).

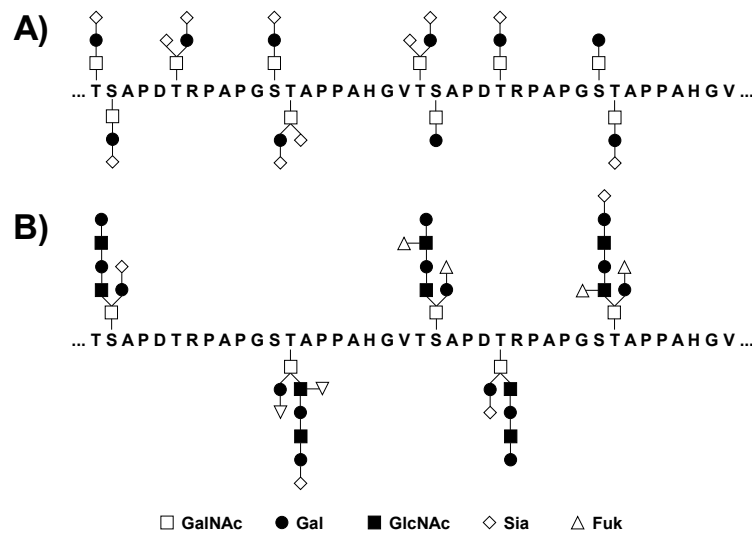


Abb. 2.8: Vergleich der Glykosylierungsmuster der VNTR-Bereiche von normalem und tumorassoziiertem MUC1

A) Tumorassoziiertes MUC1 aus T47D-Zellen. B) normales MUC1 aus humanen Epithelzellen einer milchgebenden Brust. GalNAc = N-Acetylgalaktosamin; Gal = Galaktose; GlcNAc = N-Acetylglucosamin; Sia = Sialinsäure; Fuk = Fucose. Abbildung modifiziert nach Hanisch & Müller (2000)

Das veränderte Glykosylierungsmuster resultiert in neuen antigenen Determinanten im Bereich der Oligosaccharidketten und des Peptidrückgrats von MUC1, das durch die weniger komplexe Glykosylierung für Antikörper sterisch zugänglich wird (Demaskierung).

Tumorassoziiertes MUC1 hat eine Art Doppelrolle beim Fortschritt einer Adenokarzinom-Erkrankung. Zum einen führt die MUC1-Überexpression zu einem Verlust der Polarität der Zellen und schützt die Tumorzelle vor Zelladhäsion und dem Angriff der zellulären Immunantwort. Dies kann die Entstehung von Metastasen fördern. Zum anderen wird durch die aberrante Glykosylierung und das Abscheiden von MUC1 in die Blutzirkulation eine humorale Immunantwort ermöglicht (von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000a). Es konnten Antikörper gegen Peptidepitope der VNTR-Domäne von MUC1 bei Patienten mit Adenokarzinomen nachgewiesen werden (Kotera *et al.*, 1994; Petrarca *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 1998).

Da sich tumorassoziiertes MUC1 durch seine Überexpression und die veränderten Glykosylierungen von MUC1 normaler Epithelzellen unterscheidet, eignet es sich als Angriffspunkt für eine aktive oder passive Immuntherapie von Adenokarzinomen. Bei der aktiven Immuntherapie werden synthetische MUC1-Peptide eingesetzt, um eine verstärkte Immunantwort gegen tumorassoziiertes MUC1 im Patienten hervorzurufen (von Mensdorff-Pouilly *et al.*, 2000b; Snijdwint *et al.*, 2001). Der Wirkstoff Stimuvax® beruht auf dieser Methode und wird derzeit in klinischen Studien erprobt. Die passive Immuntherapie basiert auf der systemischen Gabe von Antikörpern, die gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichtet sind. Diese Antikörper wurden durch Immunisierung von Versuchstieren oder mit Hilfe von *in vitro* Selektionssystemen erzeugt. Durch Konjugation der Antikörper mit radioaktiven oder toxischen Substanzen kann die Anti-Tumor-Wirkung verbessert werden (Maraveyas *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2007).

2.7.1 Antikörper gegen MUC1

Seit der Entdeckung und eingehenden Untersuchung von MUC1 wurden zahlreiche Antikörper gegen MUC1 generiert. Der Großteil dieser Antikörper wurde durch Immunisierung von Versuchstieren und mit Hilfe der Hybridoma-Technologie hergestellt. Es konnten Antikörper mit Spezifität zum Peptidrückgrat, zur aberranten Glykosylierung und zu Peptid-Kohlenhydrat-Epitopen erzeugt werden. Einer der ältesten und bekanntesten murinen Antikörper ist HFMG1. Er wurde mit Hilfe von MUC1, das aus menschlicher Milch isoliert wurde, generiert (Taylor-Papadimitriou *et al.*, 1981). Eine humanisierte Variante dieses Antikörpers (Verhoeyen *et al.*, 1993) befindet sich derzeit in der klinischen Erprobung. Der Vergleich eines Panels von 56 IgG Antikörpern gegen MUC1 weist die Aminosäuresequenz PDTRPAP der VNTR-Region als „hauptimmunogene“ Peptidsequenz aus. Die verschiedenen untersuchten Antikörper haben jedoch unterschiedliche Feinspezifitäten (Price *et al.*, 1998). Die funktionellen Affinitäten der Antikörper variieren zwischen $4,2 \cdot 10^{-7}$ M und $3,2 \cdot 10^{-9}$ M (Karanikas *et al.*, 1998). Der ebenfalls murine Antikörper PankoMab richtet sich gegen ein glykosylierungsabhängiges Epitop von tumorassoziiertem MUC1. Er besitzt eine apparente Affinität von bis zu $9 \cdot 10^{-10}$ M zu tumorzellassoziiertem MUC1 (Danielczyk *et al.*, 2006).

Das Hauptproblem einer passiven Immuntherapie mit Antikörpern aus Versuchstieren ist die Reaktion des menschlichen Immunsystems auf diese Antikörper (HAMA). Dies macht die Gabe solcher Antikörper über einen längeren Zeitraum unmöglich. Der Einsatz von humanen Antikörpern kann dieses Problem umgehen. Aus Antikörpergenbibliotheken nicht immunisierter Spender konnten humane Antikörperfragmente isoliert werden, die spezifisch an tumorassoziiertes MUC1 binden (Henderikx *et al.*, 1998; de Haard *et al.*, 1999). Aus einem isolierten Antikörperfragment konnte der vollständig humane Antikörper PH1-IgG1 erzeugt werden, der eine apparente Affinität von $8,7 \cdot 10^{-9}$ M (monovalente Affinität $1,4 \cdot 10^{-6}$ M) zu einem synthetischen MUC1 Peptid besitzt (Henderikx *et al.*, 2002).

Das in dieser Arbeit eingesetzte rekombinante scFv-Antikörperfragment IIB6 wurde mittels Phagen-Display aus Antikörpergenbibliotheken immunisierter Spenderinnen isoliert (Tolakis,

2004). Die Spenderinnen waren von einem metastasierenden Mammakarzinom betroffen und wurden im Rahmen eines Heilversuchs mit einem synthetischen MUC1-Glykopeptid immunisiert. Die Selektion der Antikörperfragmente erfolgte alternierend auf synthetischem MUC1-Glykopeptid und auf aus T47D-Tumorzellen isoliertem MUC1. Das Antikörperfragment hat eine Affinität von $2,3 \cdot 10^{-7}$ M zum Glykopeptid und reagiert in Immunfärbungen spezifisch mit mehr als 80 % von 228 getesteten Brustkrebsgewebeproben (Tolékis *et al.*, 2006).

2.8 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erzeugung von hochaffinen Antikörperfragmenten gegen MUC1. Hierzu sollte auf Basis des bestehenden Antikörperfragments IIB6 scFv (Tolékis, 2004) eine Affinitätsreifung erfolgen. Durch *Error-prone*-PCR sollten zufällige Mutationen im IIB6 scFv-Gen erzeugt werden und mit den mutierten scFv-Genen Antikörpergenbibliotheken hergestellt werden. Durch geeignete Phagen-Display basierte Selektionsverfahren sollten anschließend hochaffine MUC1-Binder isoliert und eine Rangfolge bezüglich ihrer Affinität erstellt werden. Weiterhin sollten ausgewählte Einzelklone für die eine hohe Affinität zum MUC1-Peptid vermutet wurde, bezüglich ihrer Spezifität und Affinität eingehend charakterisiert und mit Blick auf eine mögliche Anwendung in der Diagnostik und Therapie von Adenokarzinomen auf ihre Stabilität hin untersucht werden. Darüber hinaus sollten die apparenten Affinitäten der Antikörperfragmente durch Fusion mit geeigneten Multimerisierungsdomänen weiter gesteigert und die Stärke des Aviditätseffekts abgeschätzt werden.

3 Material

3.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
10 mL Einwegpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Chelating Sepharose FF	GE Healthcare, München
CM5-Chip	GE Healthcare, München
Dialyseschlauch VISKING	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegspatel	VWR, Darmstadt
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad, München
Filterpapier	Bio-Rad, München
Filter (Celluloseacetat, 0,45 µm)	Sartorius, Göttingen
Magnetische Streptavidin- <i>Beads</i> Dynabeads® M280	Invitrogen, Karlsruhe
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
MTP - Polypropylen	Greiner bio-one, Frickenhausen
MTP - Polystyrol	Maxisorp, Nunc, Wiesbaden
MTP - Abdeckfolie (AeraSeal, SealPlate)	Excel Scientific, Wrightwood USA
PCR-Reaktionsgefäße	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 mL / 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 15 mL / 50 mL	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht

3.2 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Blot-Apparatur	TransBlot SD	Bio-Rad, München
Chromatographieanlage	ÄKTA-Purifier	GE Healthcare, München
Chromatographiesäule	Superdex200 10/300	GE Healthcare, München
Durchflusscytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammern	Miniprotean 3 cell	Bio-Rad, München
	40-0708	Peqlab, Erlangen
ELISA-Reader	Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim

Gerät	Typ	Hersteller
ELISA-Washer	Columbus Plus	Tecan, Crailsheim
Filtrationseinheit	Nalge	Nunc, Wiesbaden
Geldokumentation	Gel Jet Imager	Intas, Göttingen
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Inkubatoren	Typ BE400	Memmert, Schwabach
	HeraCell	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Diavert	Leica, Solms
Magnetpartikelseparator	Dynal-MPC	Invitrogen, Karlsruhe
Mischgerät	Vortex Genie 2	Scientific Industries
MTP-Schüttelinkubator	Thermo Shaker PST-60H-4	Lab4you, Berlin
Netzgerät	EPS 301	GE Healthcare, München
Pipetten	Research 2 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 10 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 20 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 200 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 5000 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 8 × 10 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 8 × 100 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 8 × 300 µL	Eppendorf, Hamburg
	Research 12 × 300 µL	Eppendorf, Hamburg
Reinstwasseranalge	Arium 611	Sartorius, Göttingen
Pipettierhilfe	accu-jet	Brand, Wertheim
Schüttelinkubator	BS1 / BS4B	B.Braun, Melsungen
Sequenzierer	ABI Prism 310 Geneitc Analyzer	Applied Biosystems
Spektrophotometer	ND1000	NanoDrop, Peqlab, Erlangen
	Biochrom, Libra S11	Laborservice Onken, Grundau
SPR-Messgerät	Biacore2000	GE Healthcare, München
Sterilwerkbänke	LaminAir HLB 2472	Heraeus, Hanau
	Herasafe	Heraeus, Hanau
	MSC Adavantage	Thermo Scientific
Thermocycler	DNAEngine	Bio-Rad, München
Überkopfschüttler	Rotator	GKisker, Steinfurt
Waagen	Laboratory LC 6200 D	Sartorius, Göttingen
	E 1200 S	Sartorius, Göttingen
	A 120 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen	5414 D	Eppendorf, Hamburg
	5810 R	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau

Gerät	Typ	Hersteller
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
	Sorvall RC5	Thermo Scientific
	Sorvall RC5B Plus	Thermo Scientific
	Sorvall RC6 Plus	Thermo Scientific

3.3 Chemikalien

Alle verwendeten (Bio-)Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Fluka, Riedel-de-Haën) (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen und waren vom Reinheitsgrad p. a..

3.4 Puffer und Lösungen

Die Komponenten der Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit Reinstwasser hergestellt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Acetatpuffer	10 mM Natriumacetat; pH 4,5 bzw. pH 5,0 (adj. 10 mM Essigsäure)
Acrylamidmix	30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
BCIP-Lösung	15 g L ⁻¹ BCIP in DMF
Boratpuffer	6,2 g L ⁻¹ Borsäure; pH 8,5 (adj. 1 M NaOH)
Carbonatpuffer	35 mM NaHCO ₃ ; 15 mM Na ₂ CO ₃ ; pH 9,7
CBS	8,0 g L ⁻¹ NaCl; 0,2 g L ⁻¹ KCl; 2,08 g L ⁻¹ Zitronensäure 1·H ₂ O; pH 7,0 (adj. NaOH)
Coomassiefärbelösung	10 % Essigsäure; 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassieentfärbelösung	10 % Essigsäure
EDC	75 g L ⁻¹
Ethidiumbromidlösung	10 g L ⁻¹ Ethidiumbromid
FACS-Puffer	2 % (v/v) FCS; 2 mM EDTA in PBS
Formiatpuffer	100 mM Natriumformiat; pH 4,3 (adj. Ameisensäure)
IMAC-Bindepuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,5 M NaCl; 10 mM Imidazol; pH 7,4 (adj. 20 mM NaH ₂ PO ₄)
IMAC-Waschpuffer 1	IMAC-Bindepuffer mit 20 mM Imidazol
IMAC-Waschpuffer 2	IMAC-Bindepuffer mit 40 mM Imidazol
IMAC-Elutionspuffer	100 mM EDTA in PBS
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Laemmli-Ladepuffer 5×	500 g L ⁻¹ Glycerin; 100 g L ⁻¹ SDS; 250 mL β-Mercaptoethanol; 200 mL 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,5 g L ⁻¹ Bromphenolblau
MPBS-T	2 % (w/v) Milchpulver in PBS-T
MTT-Lösung	50 g L ⁻¹ MTT in 70 % DMF + 30 % H ₂ O ₂
NBT-Lösung	30 g L ⁻¹ NBT in 70 % (v/v) DMF
NHS	11,5 g L ⁻¹
PBS	8,5 g L ⁻¹ NaCl; 1,34 g L ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ ; 0,35 g L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-T	0,1 % (v/v) Tween20 in PBS
PBS-T für SPR-Analysen	0,005 % (v/v) Tween20 (peroxidfrei) in PBS
PDB	10 mM Tris; 20 mM NaCl; 2 mM EDTA; pH 7,5
PEG/NaCl-Lösung	20 % (w/v) PEG 6000; 2,5 M NaCl
Propidiumiodid-Lösung	500 µg mL ⁻¹
Schockpuffer	20 % (w/v) Saccharose; 50 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Stopplösung ELISA	0,5 M H ₂ SO ₄
Stripping-Puffer A	8 M Harnstoff; 1 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Stripping-Puffer B	10 % (v/v) Essigsäure; 50 % (v/v) Ethanol
Substratpuffer Immunfärbung	100 mM Tris; 0,5 mM MgCl ₂ ; pH 9,5
TAE-Puffer (1×	40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0
TBS	10 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,2 (adj. HCl)
TBS-T	0,05 % (v/v) Tween20 in TBS
TMB-Lösung A	30 mM Kaliumcitrat; 1 % (w/v) Zitronensäure; pH 4,1
TMB-Lösung B	10 mM Tetramethylbenzidin; 10 % (v/v) Aceton; 90 % (v/v) Ethanol; 80 mM H ₂ O ₂ (30 %)
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin
Trypsinlösung	10 mg L ⁻¹ Trypsin in PBS

3.5 Nährmedien und Supplemente

3.5.1 Prokaryotische Kultivierung

Medien mit komplexen Bestandteilen (Trypton, Hefeextrakt) wurden in deionisiertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Für Supplemente (Glukose, Antibiotika) wurde Reinstwasser verwendet.

Medium/Supplement	Zusammensetzung
2× YT Flüssigmedium	1,6 % (w/v) Trypton (Difco) 1 % (w/v) Hefeextrakt (Difco) 0,5 % NaCl pH 7,0
2× YT Agar	2× YT Flüssigmedium + 1,5 % (w/v) Agar-Agar
2× YT-AK Flüssigmedium	2× YT Flüssigmedium + 100 mg L ⁻¹ Ampicillin + 50 mg L ⁻¹ Kanamycin
2× YT-GA Flüssigmedium	2× YT Flüssigmedium + 100 mM Glukose + 100 mg L ⁻¹ Ampicillin
2× YT-GAC Flüssigmedium	2× YT Flüssigmedium + 100 mM Glukose + 100 mg L ⁻¹ Ampicillin + 34 mg L ⁻¹ Chloramphenicol + 50 µM D-Biotin
2× YT-T Flüssigmedium	2× YT Flüssigmedium + 50 mg L ⁻¹ Tetracyclin
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,05 % NaCl pH 7,0 20 mM Mg ²⁺ -Lösung 20 mM Glukose
Mg ²⁺ -Lösung	1 M MgCl ₂ ; 1 M MgSO ₄
Glukoselösung	2 M Glukose
Ampicillinstammlösung	100 g L ⁻¹
Kanamycinstammlösung	50 g L ⁻¹
Tetracyclinstammlösung	10 g L ⁻¹ in Ethanol
Chloramphenicolstammlösung	34 g L ⁻¹ in Ethanol

3.5.2 Eukaryotische Kultivierung

Alle Medien und Supplemente für die eukaryotische Kultivierung wurden von PAA Lab, Parsing Österreich bezogen.

Medium	Supplement
Medium für HEK293-T und T47D Zellen:	
DMEM (High Glucose)	8 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin (100×)
Medium für MCF-7 und SKOV3 Zellen:	
DMEM (High Glucose)	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin (100×) 1 % 200 mM L-Glutamin 1 % Na-Pyruvat (11 g L ⁻¹) 1 % Non Essential Amino Acids

3.6 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF' (Stratagene)	K12: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q Z\Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$
<i>E. coli</i> TG1 (GE Healthcare)	K12: $\Delta(lac-pro), hsdD5/F9traD36 proA^+ B^+, lacI^q, lac\Delta M15, supE, thi$

3.7 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	ATCC Nummer
T47D	Humane Brustkrebszelllinie (Adenokarzinom)	HTB-133
MCF-7	Humane Brustkrebszelllinie (Adenokarzinom)	HTB-22
SKOV3	Humane Eierstockkrebszelllinie (Adenokarzinom)	HTB-77
HEK293-T	Humane embryonale Nierenzelllinie	CRL-11268

3.8 Plasmide

Plasmid	Verwendungszweck
pBirAcm	Hilfsvektor zur <i>in vivo</i> -Biotinylierung
pHAL14	Phagemidvektor, Klonierung von Antikörpergenbibliotheken, Phagen-Display
pHAL11 IIB6 scFv	Phagemidvektor, Quelle für IIB6 scFv-Gen
pHAL1 D1.3 scFv	Phagemidvektor, Quelle für D1.3 scFv-Gen
pOPE101-XP	Expressionsvektor, Produktion von AK-Fragmenten
pOPE101 IIB6 scFv	Expressionsvektor, Produktion von IIB6 scFv

3.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von biomers.net (Ulm) bezogen.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'
HT-IIB6-Aff_fwd	tgctggcagctcagccggccatgg
HT-IIB6-Aff_rev	tgatggtgatgatgatgagcgccgc
MHCole1_f	cccaatacgcaaaccgcc
MHgIII_r1	ctaaagttttgctcgtctttcc
MH LacZ Pro f	ggctcgatggtgtgtgg
HT-gIII-Beginn1-rev	taaacaactttcaacagtttcagct
MKpelB_f	gcctacggcagccgctgg
MKmyc_r	gacctcttctgagatgag
IIB6-Aff2-fwd	gccgctggcttgcctgctgctggcagctcagccggccatgg
IIB6-Aff2-rev	gttctgcggcccgctgatggtgatgatgatgagcgccgc
HT_p53_f	tgatgcggccgctaccccgctgggtgacaccaccacacctctggtaaacc gctggacgaataacttcaccctgcagatccgtggtcgtgaacgtttcgaaat gttcggtgaactgaacgaagctctg
HT_p53_r	ctttggatccctagtgggtgggtgggtgggtgaggagcaccaccagaaccac ccggttctttaccagcctgagcgtctttcagttccagagcttcggttcagtt cacggaacattttcgaaacgttcacg
HT_dHLX_f	tgatgcggccgctccgaaaccgtctaccccgccgggttcttctgggtgaact ggaagaactgctgaaacacctgaagagactgctgaaagggtccgcgtaagg tgaactggaagaactgct
HT_dHLX_r	ctttggatccctagtgggtgggtgggtgggtgaggagcaccaccagaaccac ctttcagcagttctttcaggtgtttcagcagttcttccagttcacctttac gcggacctttcagcagt

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'
HT_tetraZIP_f	tgatgcgccgctccgaaaccgtctaccccgccgggttcttctcgtctgaa acagatcgaagacaaactggaagaaatcctgtctaaactgtaccacatcga aaacgaactggctcgt
HT_tetraZIP_r	ctttggatccctagtgggtgggtgggtgggtgaggagcaccaccagaaccac cacgttcacccagcagttttttgatacgagccagttcgttttcgatgtggt acagtttagacaggat
HT_ZIP_f	tgatgcgccgctccgaaaccgtctaccccgccgggttcttctcgtatgaa acagctggaagacaaagttgaagaactgctgtctaaaaactaccacctgga aaacgaagttgctcg
HT_ZIP_r	ctttggatccctagtgggtgggtgggtgggtgaggagcaccaccagaaccac gttcaccaaccagttttttcagacgagcaacttcgttttccaggtggtagt tttagacagcagt
HT-BAD_fwd	aggatgcgccgcttctccgtctaccccgccgaccccgctctccgtctacccc gccggcttctggtgggtctgaacgacatcttcgaagctcagaaaatcgaatg g
HT-BAD_rev	gcaaggatccctagtgatgatgggtgatgatggatatttgatatttagaagaac cttcgtgccattcgattttctgagcttcgaagatgtcgttcagaccaccag

3.10 Peptide

Die Peptide und Peptidmembranen wurden von der Abteilung Chemische Biologie des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig) bezogen. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Spots auf den Peptidmembranen sind in Abschnitt 5.8 angeführt

Peptid	Sequenz N' - C'
MUC1 (15 AS Cys, HPLC ger.)	APDTRPAPGSTAPPAC
MUC1 (32 AS, <i>crude</i>)	APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA
MUC1 (32 AS Biotin, <i>crude</i>)	Biotin- β -A- β -A-APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTA
MUC1 (32 AS Cys, HPLC ger.)	APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAC
SHERK2 (22 AS, HPLC ger.)	GRKTVKPEDLELLMRRQGLVC

3.11 Enzyme

Enzym	Hersteller
Combizyme DNA-Polymerase	Invitek, Berlin
Mutazyme II DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam NL
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RedTaq DNA-Polymerase	Sigma, München
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase	Promega, Mannheim
Trypsin	Sigma, München

3.12 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Human α -MUC1 IIB6, scFv (mk)	AG Dübel, TU Braunschweig
Maus α -Lysozym D1.3, scFv (mk)	AG Dübel, TU Braunschweig
Maus α -His ₆ , IgG (mk)	Roche, Penzberg
Maus α -c-myc 9E10, IgG (mk)	AG Dübel, TU Braunschweig
Ziege α -Maus IgG (pk), Fc spez., AP Konjugat	Sigma-Aldrich, München
Ziege α -Maus IgG (pk), Fab spez., HRP Konjugat	Sigma-Aldrich, München
Ziege α -Maus IgG (pk), FITC Konjugat	Sigma-Aldrich, München

3.13 Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
illustra™ GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare, München
illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam NL
BigDye® Terminator Sequencing Kit	Applied Biosystems, Waltham USA

3.14 Computerprogramme und Datenbanken

Programm	Anwendung/Anbieter
BIAevaluation 4.1	Auswertung SPR-Analysen GE Healthcare
CXP Analysis 2.2	Auswertung Durchflusszytometrie Beckman Coulter
FinchTV 1.4.0	Auswertung von DNA-Sequenzierungen Geospiza Inc.
ImageJ 1.37	Densitometrische Auswertung, Proteinquantifizierung http://rsb.info.nih.gov/ij/
JabRef 2.3.1	Literaturverwaltung http://jabref.sourceforge.net/
MikTeX 2.6	L ^A T _E X-Distribution http://miktex.org
OpenOffice.org 2.3	Protokolle, Zeichnungen, Berechnungen, Präsentationen http://de.openoffice.org
Qtiplot 0.9.3	Erzeugung von Diagrammen http://soft.proindependent.com/qtiplot.html
Photoshop Elements	Bildbearbeitung Adobe Systems
Unicorn 5.10	Auswertung Chromatographie GE Healthcare
VectorNTI 10.0	Plasmid-Verwaltung, Planung von Klonierungen Invitrogen, USA
WinEdt 5.5	L ^A T _E X-Editor http://www.winedt.com
Datenbank	Anwendung/Anbieter
IMGT	Analyse von Antikörpersequenzen http://imgt-cines.fr
NCBI	Datenbank für Gen- und Proteinsequenzen, Literaturdatenbank http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NetNGlyc 1.0 Server	Vorhersage möglicher N-Glykosylierungsstellen http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
SHAB	Analyse von Antikörpersequenzen (Abhinandan & Martin, 2007) http://www.bioinf.org.uk/abs/shab/
VBASE2-Datenbank	Analyse von Antikörpersequenzen (Retter <i>et al.</i> , 2005) http://www.vbase2.org/

3.15 Sonstiges

Produkt	Hersteller
Agarosegel-Ladepuffer 6×	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Massenstandard: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Helferphage M13K07 (Vieira & Messing, 1987)	GE Healthcare, München
Injektionslösung (für Sequenzierungen)	Millipore, Eschborn
PDEA	GE Healthcare, München
Protein-Massenstandard: Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein Standard prestained	
Core-Streptavidin	IBA, Göttingen

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* Kulturen mit Hilfe des illustra™ GFX™ Micro Plasmid Prep Kit gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die DNA-Elution erfolgte mit 50-100 µL Elutionspuffer (10 mM Tris; pH 8,0). Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt.

4.1.2 Amplifikation von DNA

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986). Die zu vervielfältigende DNA-Region wurde dabei mit flankierenden komplementären Oligonukleotiden (Primern) determiniert. Für die verschiedenen Zwecke der DNA-Amplifikation sind jeweils die Zusammensetzung und der Temperaturverlauf angegeben.

4.1.2.1 Error-prone-PCR

Mit der im GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit enthaltenen Mutazyme II DNA-Polymerase wurde die *Error-prone*-PCR zum Erzeugen von Mutationen in den Zielbereich durchgeführt. Mutazyme II sollte dabei eine Mutationsrate von bis zu 16 Basenpaaraustauschen pro 1000 bp und PCR erreichen (Herstellerangabe) und eine Mutationshäufigkeit von A,T → N (50,7 %) und G,C → N (43,8 %) (Herstellerangabe) aufweisen. Die Annealing-Temperatur während der Reaktion war abhängig vom eingesetzten Primer-Set.

Tab. 4.1: *Error-prone*-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil

Komponente	Volumen [µL]	Temperatur [°C]	t [s]
Template DNA (<1 ng)	1	95	120
10× Reaction Buffer	2,5	95	60
40 mM dNTPs (10 mM each)	0,5	65*	60
HT-IIB6-Aff_fwd (10 pmol µL ⁻¹)	0,5	72	70
HT-IIB6-Aff_rev (10 pmol µL ⁻¹)	0,5		
Mutazyme II DNA-Polymerase (2,5 U µL ⁻¹)	0,5	72	600
dH ₂ O	19,5	16	∞

* Die Annealing-Temperatur lag bei allen Primersets bei 65 °C.

Ausnahme: MKpelB_f | MKmyc_r: 55 °C.

4.1.2.2 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR diente anstatt aufgereinigter DNA eine Bakterieneinzelkolonie als Template für die Amplifikation. Die Zellen wurden während der Denaturierungsphase aufgeschlossen und die enthaltene DNA wurde verfügbar. Dieses Verfahren beschleunigte und vereinfachte das Screening und die Analyse von Einzelklonen, z. B. nach Klonierungen.

Tab. 4.2: Kolonie-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	t [s]
gepicktes Bakterienpellet	≈ 1	95	120
REDTaq™ PCR Reaktion Buffer 10×	5	65* / 55†	60
40 mM dNTPs (10 mM each)	1		60
MH LacZ Pro f* / MKpelB_f† (10 pmol μL^{-1})	0,5		30
MHglIII_r1* / MKmyc_r† (10 pmol μL^{-1})	0,5		70
REDTaq™ DNA-Polymerase (1 U μL^{-1})	1	72	600
dH ₂ O	41	16	∞

* Primerset zum Nachweis von pHAL14-basierten Plasmiden, † Primerset zum Nachweis von pOPE101 basierten Plasmiden.

4.1.2.3 PCR zur Erzeugung neuer DNA-Abschnitte

Kürzere DNA-Abschnitte (<250 bp) können ohne Vorhandensein einer Template-DNA mit Hilfe langer, überlappender Oligonukleotide erzeugt werden. Die Primer überlappen am jeweiligen 3'-Ende miteinander und erlauben eine PCR-basierte „Auffüllreaktion“. Die Verwendung der Combizyme DNA-Polymerase ermöglichte eine direkte Klonierung der erzeugten DNA-Fragmente mit Hilfe der *Topo-TA-cloning*-Technologie.

Tab. 4.3: PCR zur Erzeugung neuer DNA-Abschnitte: Zusammensetzung und Temperaturverlauf

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	t [s]
10× Optiperform Buffer III	5	94	90
50 mM MgCl ₂	2,5	94 67 72	60
40 mM dNTPs (10 mM each)	5		45
Optizyme Enhancer	10		30
Primer-fwd (10 pmol μL^{-1})	2,5		30
Primer-rev (10 pmol μL^{-1})	2,5	72	600
Combizyme DNA-Polymerase (4 U μL^{-1})	0,5	16	∞
dH ₂ O	41		

4.1.3 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösungen (z. B. PCR) oder Agarosegelen erfolgte mit dem illustra™ GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit gemäß der Herstellerangabe. Die DNA wurde mit 10-50 μL Elutionspuffer (10 mM Tris; pH 8,0) oder mit 10-50 μL dH₂O eluiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch ermittelt.

4.1.4 Präzipitation von DNA

Die DNA-Präzipitation kann zur Umpufferung von DNA-Lösungen (z. B. nach Ligation) eingesetzt werden. Die DNA-Lösung wurde mit dH₂O auf 100 µL aufgefüllt. Es wurden 10 µL 3 M NaAcetat und 250 µL Ethanol (100 %) zugegeben. Nach zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur schloss sich ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt mit $16.000 \times g$ bei 4 °C an. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet 2× in 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation und Verwerfen des Überstands konnte die DNA in der gewünschten Lösung (z. B. dH₂O) aufgenommen werden.

4.1.5 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können lineare DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Ein 1-2 %iges Agarosegel wurde mit der zu untersuchenden DNA-Lösung beladen. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen diente ein Standard mit DNA-Fragmenten definierter Größe. Die Trennung der DNA im Gel erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes (100 V, 300 mA). Die aufgetrennte DNA wurde mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) nachgewiesen.

4.1.6 DNA Konzentrationsbestimmung - photometrisch

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in Lösungen wurden diese bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch vermessen. Eine Absorption = 1 (Schichtdicke 1 cm) entsprach dabei einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ doppelsträngiger DNA.

4.1.7 Enzymatische Restriktion von DNA

Der Verdau von DNA mit Typ II Restriktionsendonukleasen erlaubt das sequenzgenaue Schneiden und die Herstellung von DNA-Fragmenten mit definierter Größe. Hierzu wurde DNA (0,1 - 3 µg) mit bis zu drei Enzymen für bis zu 18 Stunden (im Bedarfsfall kürzer) beim jeweiligen Temperaturoptimum der Enzyme (meist 37 °C) inkubiert. Ein typischer Ansatz hatte ein Volumen von 30 µL und ist in Tab. 4.4 angeführt. Nach der Inkubation erfolgte, wenn möglich, die Inaktivierung der Restriktionsenzyme (65 °C; 15 min), der sich eine Aufreinigung oder ggf. die Dephosphorylierung der DNA anschloss.

Tab. 4.4: Typische Zusammensetzung eines Restriktionsverdau

Komponente	Volumen [μL]
DNA	<25
Restriktionsenzym (z. B. <i>NcoI</i>) 10 U μL^{-1}	1
Restriktionsenzym (z. B. <i>NotI</i>) 10 U μL^{-1}	1
Reaktionspuffer 3 (10 \times)	3
dH ₂ O	ad 30

4.1.8 DNA-Dephosphorylierung

Während der DNA-Dephosphorylierung werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen von linearisierten DNA-Fragmenten (z. B. nach Restriktionsverdau) abgespalten, um eine Religation zu vermeiden. Die Dephosphorylierung erfolgte durch Zugabe von 1 μL *Shrimp alkaline phosphatase* (10 U μL^{-1} ; MBI Fermentas) zum inaktivierten Restriktionsansatz. Nach Inkubation (37 °C; 1 h) wurde die Phosphatase ebenfalls hitzeinaktiviert (65 °C; 15 min). Anschließend wurde die linearisierte, dephosphorylierte DNA aufgereinigt.

4.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von T4-DNA-Ligase. Die Reaktion wurde bei 16 °C über Nacht (üN) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ligationsansätze variierte je nachdem, ob eine „normale“ Klonierung (molares Verhältnis von Vektor zu Insert 1 : 10) erfolgte oder eine Antikörpergen-Bibliothek (Verhältnis 1 : 3) hergestellt wurde. Die für das erforderliche Verhältnis benötigten DNA-Mengen errechneten sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Menge Vektor [ng]} \cdot \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} \cdot \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert [ng]} \quad (4.1)$$

Tab. 4.5: Zusammensetzung Ligation:

Angegeben sind die Zusammensetzungen für eine normale Klonierung und die Herstellung einer Antikörpergenbibliothek.

Komponente	normale Klonierung		Erzeugung von Genbibliotheken	
	Volumen [μL]	Menge	Volumen [μL]	Menge
10 \times Reaktionspuffer	1	1 \times	10	1 \times
T4-DNA-Ligase	0,5	1,5 U	1	3 U
Vektor DNA	1-2	100 ng	10-20	1000 ng
Insert DNA	4-7	\approx 200 ng	40-70	\approx 750 ng
dH ₂ O	ad 10		ad 100	

4.1.10 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde das BigDye® Terminator Sequencing Kit (Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1982)) verwendet. Mit den Kit-Komponenten wurde eine Sequenzier-PCR durchgeführt. Anschließend wurde die DNA mittels Ethanol-Präzipitation gereinigt, in Injektionspuffer aufgenommen und die Proben in einem ABI Genetic Analyzer 310 vermessen. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit FinchTV 1.4 ausgewertet und ein *Alignment* mit der theoretischen Sequenz durchgeführt.

Tab. 4.6: Sequenzier-PCR: Zusammensetzung und Temperaturprofil

Komponente	Volumen [μL]	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	t [s]
DNA-Template (≈ 30 ng)	1	94	60
Reaktionspuffer 5 \times	2	94	30
40 mM dNTPs (10 mM each)	1	50	15
Primer (10 pmol μL^{-1})	0,5	72	240
BigDye Reaktionsmix	1		
dH ₂ O	ad 10	16	∞

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Transformation von *E. coli*

Plasmid-DNA und Ligationsansätze wurden per Elektroporation in kompetente *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) eingebracht. Mit Ligationsansätzen wurde vor der Transformation eine DNA-Präzipitation durchgeführt und die DNA in dH₂O resuspendiert. Anschließend wurde 1 μL Ligationsansatz bzw. Plasmidpräparation mit 5 μL Zellen in 45 μL dH₂O (eiskalt) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 1 mm) gegeben. Bei der Bibliotheken-Herstellung wurden 25 μL Zellen mit 25 μL gefälltem Ligationsansatz gemischt. Die Transformation erfolgte durch einen elektrischen Puls von 1,7 kV für ≈ 5 ms. Anschließend wurden 950 μL vorgewärmtes (37 $^{\circ}\text{C}$) SOC-Medium zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 600 rpm im Thermomixer inkubiert. Danach wurden Aliquots (1-100 μL) der Zellsuspension auf Selektivagarplatten (2 \times YT-GA) ausplattiert. Bei der Bibliotheken-Herstellung wurde ein 10 μL Aliquot zur Bestimmung der Transformationseffizienz eingesetzt. Der gesamte Rest des Transformationsansatzes wurde auf 25 \times 25 cm Selektivagarplatten ausplattiert. Die Platten wurden üN bei 37 $^{\circ}\text{C}$ bebrütet.

4.2.2 Infektion von *E. coli* und Produktion von M13K07-Antikörperphagen

Zur „Verpackung“ von Antikörpergenbibliotheken war die Infektion von *E. coli*-Zellen mit M13-Phagen erforderlich. Hierzu wurden zunächst *E. coli*-Flüssigkulturen angelegt. Bei der Antikörpergenbibliothekenherstellung wurden die mit Phagemiden transformierten Zellen verwendet. Die

Zellen wurden bei 37 °C in Schüttelkolben bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ ($\cong 5 \cdot 10^8$ cfu) kultiviert. Anschließend wurden 20 mL der Kultur ($\cong 1 \cdot 10^{10}$ cfu) abgenommen und mit einem 20fachen Überschuss an M13K07 Helferphagen ($\cong 2 \cdot 10^{11}$ cfu) für 30 min bei 37 °C ohne Schütteln inkubiert, danach für 30 min bei 37 °C und 250 rpm. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei $3220 \times g$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 mL $2\times$ YT AK Medium resuspendiert und in 250 mL $2\times$ YT AK gegeben. Während der Kultivierung üN bei 30 °C und 250 rpm erfolgte die Produktion der Antikörperphagen. Die Zellen wurden danach per Zentrifugation ($10000 \times g$, 10 min) abgetrennt. Die Antikörperphagen befanden sich im Kulturüberstand und wurden durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl Lösung und Inkubation für >1 h auf Eis ausgefällt. Nach Zentrifugation (1 h; 4 °C; $10000 \times g$) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL PDB gelöst. Durch Zugabe von 1/5 Volumen PEG/NaCl und Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte eine zweite Fällung der Antikörperphagen. Nach Zentrifugation (30 min, 4 °C, $3220 \times g$) wurde das Zellpellet in 1 mL PDB gelöst. Zur Abtrennung noch enthaltener Zellreste wurde die Phagensuspension für 10 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand in ein 2 mL Schraubröhrchen überführt.

4.2.3 Titerbestimmung von M13-Antikörperphagen

Zur Bestimmung des Titers der produzierten Antikörperphagen wurde die so genannte *cfu*-Methode verwendet. Hierbei wird die Zahl der infektiösen Partikel durch Infektion von untransformierten *E. coli* XL1-Blue MRF' und die anschließende Kultivierung dieser Zellen auf Selektivagarplatten ermittelt. Zunächst wurden die *E. coli*-Zellen in $2\times$ YT-T Medium bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ bei 37 °C und 250 rpm in Flüssigkultur angezogen. Mit den Phagensuspensionen wurden parallel Verdünnungsreihen in PBS angelegt. Anschließend wurden 50 µL *E. coli*-Kultur mit 10 µL der jeweiligen Verdünnung der Phagensuspension gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Infektion wurden die Zellen auf Selektivagarplatten ausplattiert ($2\times$ YT-GA) und üN bei 37 °C inkubiert. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien (cfu) und der bekannten Verdünnungsstufe der Phagensuspension konnte der korrespondierende Phagentiter berechnet werden.

4.2.4 Selektion mit Antikörperphagenbibliotheken

4.2.4.1 Off-rate-Panning

Das Panning erfolgte in MTP-Streifen (Nunc, Maxisorp), in deren Kavitäten MUC1-Peptid (15 AS Cys) in verschiedenen Mengen (100 ng; 10 ng; 1 ng) gekoppelt wurde. Das Beschichten erfolgte in Carbonatpuffer üN bei 4 °C. Nach einem Waschschrift im ELISA-Washer ($3\times$ PBS-T) wurden unspezifische Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit MPBS-T abgeblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden pro Kavität $4 \cdot 10^{10}$ Phagenpartikel (Bibliothek „A“) für 3 h in MPBS-T inkubiert. Es folgten 3 Waschschriffe im ELISA-Washer (1× Waschschrift = Panning-Programm: $10\times$ PBS-T *bottom-wash*-Zyklus). Danach wurde der

MTP-Streifen für sieben Tage in 2 L PBS unter leichtem Rühren bei 4 °C inkubiert. Es folgten zweit weitere Waschschritte im ELISA-Washer (Panning-Programm) und die erneute Inkubation in 1 L PBS bei 4 °C für weitere sieben Tage. Anschließend folgte ein Waschschritt im ELISA-Washer (Panning-Programm) und eine weitere Inkubation für sieben Tage in 1 L PBS bei 4 °C. Der MTP-Streifen wurde final im ELISA-Washer gewaschen (normales Programm 3× PBS-T) und die in den Kavitäten gebundenen Antikörperphagen wurden durch Inkubation von 200 µL Trypsinlösung (10 µg mL⁻¹) abgelöst. Von den Eluaten wurden Verdünnungsreihen in PBS angelegt und eine Titerbestimmung der enthaltenen infektiösen Partikel durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.3). Mit den Eluaten erfolgte eine Phagenamplifikation. Hierzu wurden die gesamten Eluate mit je 5 mL *E. coli* XL1-Blue MRF' (OD₆₀₀ ≈ 0,5) inkubiert. Nach Infektion der Zellen wurden diese auf 15 cm Selektivagarplatten (2× YT-GA) ausplattiert und üN bei 37 °C bebrütet.

4.2.4.2 Panning in Lösung

Zunächst wurden 50 µL Streptavidin-*Beads* (Dynabeads, M280) in 1 mL MPBS-T eine Stunde inkubiert. Die *Beads* wurden magnetisch fixiert (Dynal MPC) und der Überstand abgenommen. Anschließend wurden $1 \cdot 10^{13}$ cfu der Bibliothek „B“ mit den geblockten *Beads* 30 min inkubiert. Dies diente zur Abreicherung von Antikörperphagen, die unspezifisch an Streptavidin-*Beads* binden. Der Überstand wurde dann für das Panning verwendet. Hierzu wurde in der ersten Panning-Runde eine 60 nM MUC1-Peptid (32 AS Biotin)-Lösung (in 1,5 mL Panning-Block-Puffer (MPBS-T + 2 % BSA)) mit den präinkubierten Antikörperphagen für 1 h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler (ÜKS) bei 12 U min⁻¹ inkubiert. Das *Capturing* der an MUC1-Peptid (32 AS Biotin) gebundenen Antikörperphagen erfolgte durch Zugabe von $6,5 \cdot 10^7$ Streptavidin-*Beads* für 15 min. Danach wurden die *Beads* magnetisch abgetrennt und der Überstand verworfen. Die *Beads* wurden 10× gewaschen (je 1,5 mL: 3× PBS-T, 2× MPBS-T, 2× PBS, 1× MPBS und 2× PBS). Anschließend wurden die an die *Beads* gebundenen Antikörperphagen mit 500 µL Trypsinlösung (10 µg mL⁻¹) eluiert. Die *Beads* wurden verworfen und mit dem Überstand wurde eine Titerbestimmung durchgeführt. Die eluierten Phagen wurden amplifiziert und für die nächste Panningrunde verwendet. Die weiteren Panningrunden verliefen identisch, bis auf Änderungen bei der verwendeten Phagenmenge, der eingesetzten Konzentration des MUC1-Peptids (32 AS Biotin) und der Inkubationszeit (vgl. Abschnitt 5.2.2).

4.2.4.3 Kompetitives Panning in Lösung

Das kompetitive Panning wurde prinzipiell wie das Panning in Lösung durchgeführt. Nach der Inkubation der Antikörperphagen auf biotinyliertem MUC1-Peptid (32 AS) wurde jedoch nicht direkt mit dem Waschen begonnen, sondern ein Überschuss eines Bindungskompetitors zugegeben. Als Kompetitor diente unmarkiertes Antigen (MUC1-Peptid (32 AS)) oder ein löslicher MUC1-Binder (HT186-D11 scFv). In beiden Fällen wurde zu dem Antikörperphagen-Antigen (1 nM MUC1-Peptid (32 AS Biotin))-Gemisch ein 1000facher Überschuss (1 µM) an Kompetitor

gegeben und für sieben Tage bei 4 °C im ÜKS bei 12 U min⁻¹ inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* abgetrennt und 10× gewaschen (s. o.). Nach der tryptischen Elution der gebundenen Antikörperphagen wurde eine Titerbestimmung und eine Phagenamplifikation durchgeführt.

4.2.5 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen und -kulturen wurde zu 750 µL einer üN Flüssigkultur 250 µL 80 % (v/v) Glycerin in ein Mikroschraubröhrchen gegeben. Nach Schockgefrieren in flüssigem N₂ wurden die Kulturen bei -80 °C gelagert.

4.2.6 Produktion von scFv-Fragmenten im MTP-Maßstab

Zur ersten Charakterisierung von scFv-Fragmenten wurden diese in Einzelklonen im MTP-Maßstab produziert. Nach dem Panning wurden die Einzelkolonien direkt von den Selektivagarplatten isoliert. In eine PP-Mikrotiterplatte wurden pro Kavität 150 µL 2× YT-GA Flüssigmedium vorgelegt und jede Vertiefung mit Zellen einer Einzelkolonie beimpft. Die MTP wurde mit einer Abdeckfolie verschlossen und bei 37 °C, 1200 rpm und 37 °C üN inkubiert. Von diesen Kulturen wurden je 10 µL abgenommen und damit eine weitere PP-MTP (150 µL 2× YT-GA pro Kavität) beimpft. Diese neue Platte wurde für 2 h bei 37 °C und 1200 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3220 ×g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2× YT-A + 50 µM IPTG resuspendiert. Die Produktion löslicher scFvs erfolgte üN bei 30 °C und 1200 rpm. Nach Zentrifugation bei 3220 ×g für 10 min wurde der Überstand abgenommen und für weitere Untersuchungen verwendet. Da die verwendeten Phagemide zwischen dem scFv- und dem gIII-Gen ein *Amber*-Stopcodon tragen, war lediglich <1 % aller scFv-Fragmente als Fusionsprotein mit pIII zu erwarten.

4.2.7 Produktion von scFv-Fragmenten im Schüttelkolben-Maßstab

Vor der Produktion größerer Mengen an scFv-Fragmenten musste zunächst eine Umklonierung der scFv-kodierenden Genabschnitte in den Expressionsvektor pOPE101-XP erfolgen. Nach der Umklonierung wurden die Antikörperfragmente im *E. coli*-System exprimiert. Für die Vorkultur wurden 50 mL 2× YT-GA Medium direkt aus einer Glycerinkultur beimpft und üN bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Anschließend wurden 3× 330 mL 2× YT-GA Medium mit je 15 mL Vorkultur auf eine OD₆₀₀ ≈ 0,15 inokuliert. Bei 37 °C und 250 rpm wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,9 kultiviert. Es folgte die Zugabe von 16,5 µL 1 M IPTG (Endkonzentration 50 µM) zur Induktion der Antikörperexpression. Für 3 h wurden die Zellen bei 25 °C und 250 rpm kultiviert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 4200 ×g. Für die Produktion von *in vivo* biotinylierten scFv-Fragmenten wurden *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen verwendet, die neben dem scFv-Expressionsvektor noch das Helferplasmid pBirAcm trugen. Die Kultivierung erfolgte in 2× YT-GAC Medium, die Expression der scFv-Fragmente und der Biotin-Ligase (BirA) wurde

mit 50 μ M IPTG induziert. Die übrigen Parameter entsprachen denen der Produktion von nicht biotinylierten scFv-Fragmenten.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Periplasma-Präparation von *E. coli*

Nach Beendigung der Zellkultivierung und der Produktion der Antikörperfragmente wurden die Zellen durch Zentrifugation der Kultur abgetrennt (vgl. Abschnitt 4.2.7). Das Zellpellet wurde in eiskaltem Schockpuffer resuspendiert (1 mL Schockpuffer pro 10 mL Kulturvolumen). Die Suspension wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert und in zweiminütigen Intervallen durchmischt. Nach Zentrifugation ($30000 \times g$, 30 min) wurde der Überstand abgenommen und gegen 5 L PBS üN dialysiert.

4.3.2 IMAC-Aufreinigung von scFv-Fragmenten

Die dialysierten periplasmatischen Extrakte wurden durch Zugabe von Stammlösungen (5 M NaCl; 5 M Imidazol) auf 0,5 M NaCl und 10 mM Imidazol eingestellt. Diese Werte entsprachen denen des IMAC-Bindepuffers. Die periplasmatischen Extrakte wurden mit 0,5 - 0,7 mL Chelating Sepharose FF (mit Ni^{2+} -Ionen beladen) für 60 min bei 4 °C inkubiert (ÜKS , 12 U min^{-1}). Die Matrix wurde per Zentrifugation ($500 \times g$; 5 min) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und die Matrix mit 4 mL IMAC-Waschpuffer 1 für 5 min inkubiert. Nach erneuter Matrixabtrennung wurde mit 4 mL IMAC-Waschpuffer 2 gewaschen. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte die Elution der gebundenen scFv-Fragmente durch Inkubation der Matrix mit 2 mL IMAC-Elutionspuffer. Die Eluate wurden fraktioniert und bei -80 °C gelagert.

4.3.3 SDS-PAGE

Für die diskontinuierliche Proteingelelektrophorese wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Diese bestanden aus einem Trenn- und einem Sammelgel und wurden wie in Tab. 4.7 angegeben angesetzt.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad Mini-Protean) gegossen und auspolymerisiert. Auf das Trenngel wurde anschließend das Sammelgel gegossen und ein entsprechender Probenkamm eingesetzt. Nach Polymerisation wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt und diese mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit $5 \times$ Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden sie zusammen mit einem Proteinmarker (molarer Massenstandard) in das SDS-PAA-Gel geladen und bei 25 mA und 300 V für ca. 50 min elektrophoretisch aufgetrennt.

Tab. 4.7: Zusammensetzung SDS-PAA-Proteingele: Angegeben sind die eingesetzten Mengen für die Herstellung von einem 12 %igen Trenn- und einem 4 %igen Sammelgel

Komponente	Volumen [μ L]	
	Trenngel	Sammelgel
Acrylamidmix	1600	260
1,5 M TrisHCl pH 8,8	1000	-
1 M TrisHCl pH 6,8	-	200
10 % SDS	40	15
APS	40	15
TEMED	2	2
dH ₂ O	1300	1000

4.3.4 Coomassiefärbung von Proteingelen

Nach beendeter Proteingelektrophorese wurden die Gele in 20 mL Coomassie-Färbelösung gegeben, kurz in der Mikrowelle erwärmt und für 10 min gefärbt. Die Gele wurden anschließend in erwärmte Entfärber-Lösung gegeben und für mindestens 20 min entfärbt.

4.3.5 Quantifizierung von Proteinen

Durch Auftrennung von Proteinproben und eines Standards (scFv-Standard: TM44-C7.3) in verschiedenen Verdünnungen konnte anhand der Färbintensität Coomassie-gefärbter Proteingele die Proteinkonzentration ermittelt werden. Hierzu wurden die eingescannten Gele mit Hilfe der Software ImageJ (V.1.37) densitometrisch ausgewertet. Der Bereich der Zielprotein-Bande wurde markiert und die Farbintensität mit Hilfe eines Histogrammplots ermittelt. Die Peakflächen der korrespondierenden Proteinbanden konnten beim scFv-Standard mit den bekannten Proteinkonzentrationen korreliert werden und erlaubten das Anlegen einer Kalibrier-Kurve und die Ermittlung der Gleichung der linearen Regressionsgeraden. Mit Hilfe der Geradengleichung und den im Histogramm ermittelten Peakflächen der unbekannten Proben konnten deren Proteinkonzentrationen berechnet werden.

4.3.6 Western Blot

Durch Western Blotting können mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Hierzu wurden zwei Filterpapiere mit Transferpuffer getränkt und die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert. Die Membran wurde auf ein Filterpapier gegeben und das Proteingel auf die Membran gelegt. Das Gel wurde ebenfalls mit einem Filterpapier bedeckt. In einer Transferkammer wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes (20 V; 330 mA; 45 min) die Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

4.3.7 Immunfärbung

Auf PVDF-Membran geblottete Proteine können mittels Immunfärbung nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Membran bei Raumtemperatur 30 min in MPBS-T inkubiert und unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 3× mit PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation eines proteinspezifischen Antikörpers (z. B. Maus- α -c-myc-IgG 9E10) in MPBS-T für 60 Minuten. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS-T wurde der Zweitantikörper (z. B. Ziege- α -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat 1:2000 in MPBS-T) für 60 min inkubiert. Nach 3× Waschen in PBS-T wurde die Membran zusätzlich 2× in Substratpuffer gewaschen. Es folgte die Immunfärbung durch Inkubation der Membran in Substratlösung (NBT/BCIP je 1:100 in Substratpuffer). Die Färbereaktion wurde durch Waschen der Membran mit dH₂O gestoppt.

4.3.8 Antigen-ELISA

Die jeweiligen Antigene wurden in gewünschter Konzentration in Carbonatpuffer pH 9 bei 4 °C an die Mikrotiterplatte gebunden. Die Antigenlösungen wurden durch 3maliges Waschen mit PBS-T im ELISA-Washer entfernt. Mögliche reaktive Bereiche der Kavitäten wurden durch Inkubation mit jeweils 350 μL MPBS-T für 1 h bei Raumtemperatur abgeblockt. Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurden die antigenspezifischen Antikörperfragmente (gelöst in MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurde der erste Nachweisantikörper (z. B. Maus- α -c-myc IgG 9E10 1:500 in MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (100 μL pro Kavität). Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurde der zweite Nachweisantikörper (z. B. Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat 1:10000 in MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (100 μL pro Kavität). Nach Waschen der Platte im ELISA-Washer wurde die Substratlösung (TMB-A + TMB-B; Verhältnis 21:1) inkubiert (100 μL pro Kavität). Die Färbereaktion erfolgte für 5-20 Minuten und wurde durch Zugabe von 100 μL 0,5 M H₂SO₄ gestoppt. Die Säurezugabe bewirkte einen Farbumschlag von Blau nach Gelb. Anschließend wurde die Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Referenzmessung bei $\lambda = 620 \text{ nm}$) für jede Vertiefung im Tecan Sunrise ELISA-Reader ermittelt.

4.3.9 Epitop-Kartierung

Die Färbung von Peptid-Spots auf Celluloseacetatmembranen wurde prinzipiell wie die Färbung in Abschnitt 4.3.7 durchgeführt. Jedoch erfolgte nach dem Block-Schritt noch die Inkubation von Peptid-spezifischen Antikörpern (30 μg scFv-Fragment in 15 mL MPBS-T) für 1 h bei Raumtemperatur. Die gebundenen scFv-Fragmente wurden über die Antikörper Maus- α -c-myc-IgG 9E10 (1:500 in MPBS-T) und Ziege- α -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat (1:2000 in MPBS-T) nachgewiesen. Vor der Entwicklung wurde jeweils 1× mit TBS-T und CBS gewaschen. Als Substrat diente MTT/BCIP (100 μL 1 M MgCl₂ + 80 μL BCIP + 120 μL MTT in 20 mL CBS). Die Entwicklung der Färbung dauerte 30 min bis 4 h. Anschließend wurden die Peptid-Membranen eingescannt und für weitere Färbungen regeneriert. Waschschr. (20 mL, je 10 Min): 2×x DMF;

2× dH₂O; 2× Stripping-Puffer A; 2× dH₂O; 2× Stripping-Puffer B; 2× 100 % Ethanol; Lagerung bei -20 °C.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Die Kultivierung adhärenter humaner Zelllinien erfolgte in 10 cm Polystyrol-Gewebekulturschalen mit Zelllinien-spezifischen Medien (vgl. Abschnitt 3.5.2) bei 37 °C und 7 % CO₂. Die Zellen wurden bei ca. 70 % Konfluenz geerntet. Dafür wurden sie zunächst mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend mit 1 mL Trypsin-Lösung von den Kulturschalen gelöst und vereinzelt. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 10 mL Medium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

4.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden pro Messung 200.000 Zellen für eine Immunfärbung verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (1000 ×g; 5 min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit den MUC1-spezifischen scFv-Fragmenten für 1 h auf Eis inkubiert (1 µg scFv in 3 mL FACS-Puffer). Der folgende Waschschrift beinhaltet eine Zentrifugation (1000 ×g; 5 min), Verwerfen des Überstands, die Resuspension der Zellen in 3 mL FACS-Puffer, eine erneute Zentrifugation (1000 ×g; 5 min), Verwerfen des Überstands und die Resuspension der Zellen in 3 mL FACS-Puffer, in dem der erste Antikörper des Nachweissystems (Maus-αHis₆-IgG 1:50) gelöst war. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Anschließend folgten ein Waschschrift (s. o.) und die Inkubation mit dem zweiten Nachweisantikörper (Ziege-α-Maus-IgG FITC-Konjugat 1:200) für 30 Minuten auf Eis. Nach einem weiteren Waschschrift (s. o.) wurden die Zellen in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung im Cytomics FC500 (Beckman Coulter) auf Eis aufbewahrt. Als Negativ-Kontrolle wurden alle Zelllinien nur mit den Sekundär-Antikörpern inkubiert. Als Mock-Kontrolle zur Lebend/Tot-Unterscheidung wurde ein Ansatz jeder Zelllinie nur mit FACS-Puffer (ohne Antikörper) inkubiert und direkt vor der Messung mit 5 µL Propidiumiodid-Lösung (500 µg mL⁻¹) gefärbt. Die Messungen mit den Mock-Kontrollen dienten zum Einrichten der Messfenster. Im FSC-SSC-Plot wurden die lebenden Zellen für die Analyse ausgewählt. Gemessen wurde die FITC-vermittelte Fluoreszenzintensität (Fl-1).

4.5 Biophysikalische Methoden

4.5.1 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte an einem ÄKTA-Purifier System. Es wurde eine vom Hersteller gepackte Superdex200 10/300 GL Säule verwendet. Die Fließgeschwindigkeit für alle Chromatographieläufe betrug $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Es wurde ein Probenvolumen von $200 \text{ }\mu\text{L}$ ($400 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1} \hat{=} 80 \text{ }\mu\text{g}$) scFv-Fragment für jede Trennung appliziert. Der Verlauf der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde ausgewertet.

4.5.2 Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Die kovalente Bindung von Peptiden an den CM5-Messchip erfolgte durch eine Thiol-Kopplung, bei der der C-terminale Cysteinrest der Peptide für die Kopplungsreaktion genutzt wurde. Die Reaktion wurde gemäß der Herstellerempfehlung durchgeführt (BIAapplications Handbook). Die Chipoberfläche wurde zweistufig zunächst mit NHS/EDC und dann mit PDEA (80 mM in Borat-Puffer) aktiviert. Das MUC1-Peptid (15 AS Cys) ($20 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) wurde in 10 mM Acetatpuffer $\text{pH } 4,5$ mit 14 respektive 47 RU gekoppelt, das SHERK2 Peptid ($1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) als Negativkontrolle in 10 mM Acetatpuffer $\text{pH } 5,0$ mit 10 bzw. 50 RU . Die verbliebenen reaktiven Gruppen wurden mit einer 50 mM L-Cystein-Lösung abgesättigt. Alle kinetischen Messungen zur Bestimmung der Bindungseigenschaften wurden mit einer Flussrate von $50 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ durchgeführt. Die Assoziationsphase betrug jeweils 300 s , die Dissoziationsphase 600 s . Die Messungen wurden gemäß den Angaben im BIAevaluation Handbook ausgewertet. Mögliche Änderungen sind direkt im Ergebnisteil angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Erstellung von mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken

Zur Generierung von affinitätsgereiften Varianten des Antikörperfragments IIB6 scFv war es nötig, Mutationen in das korrespondierende Gen einzubringen. Aus der Vielzahl per Zufallsmutagenese erzeugter Varianten wurden Antikörpergenbibliotheken kreiert, validiert und für Selektionsprozesse eingesetzt. Die Resultate der Erzeugung von zwei mutagenisierten Antikörpergenbibliotheken werden hier angeführt.

5.1.1 Bibliothek „A“

Die Antikörpergenbibliothek „A“ basiert auf dem Phagemid-Vektor pHAL14 (Hust *et al.*, 2007a) und enthält zufällige Punktmutationen im Gen für das MUC1-spezifische Antikörperfragment IIB6 scFv (Toleikis, 2004), die mit Hilfe von *Error-prone*-PCR generiert wurden. Das Gen für IIB6 scFv wurde mit einem Random-Mutagenese PCR-Kit (GeneMorphII, Stratagene) aus dem vorhandenen Plasmid pHAL11-IIB6-scFv mit den spezifischen Primern HT-IIB6-Aff_fwd und HT-IIB6-Aff_rev amplifiziert (35 Zyklen). Nach der Reinigung des PCR-Produkts mit Hilfe eines PCR-purification-Kits (GFX, GE-Healthcare) wurde die enthaltene DNA verdünnt und eine Menge von ≈ 1 ng DNA als Template für weitere *Error-prone*-PCR verwendet. Durch weitere Runden konnte die Mutationsrate erhöht werden. Insgesamt wurden nach diesem Verfahren vier *Error-prone*-PCRs nacheinander durchgeführt. Aliquots von allen *Error-prone*-PCR-Runden wurden im Agarosegel auf strukturelle Integrität untersucht (Abb. 5.1).

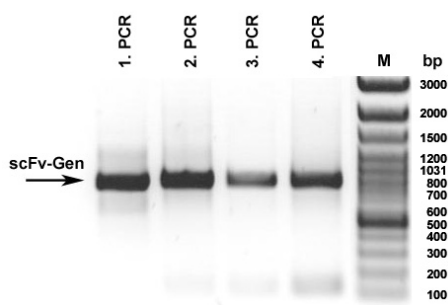


Abb. 5.1: Vier *Error-prone*-PCRs: Bibliothek „A“

5 μ L Aliquots aus 4 *Error-prone*-PCRs wurden im Agarosegel (1 %) aufgetrennt. Vollständige scFv-Genfragmente resultieren nach der PCR in DNA-Banden bei 838 bp.

Nach der vierten PCR wurde das gewonnene PCR-Produkt für die Klonierung der Antikörpergenbibliothek verwendet. Die DNA des Phagemid Vektors pHAL14 und die DNA des mutierten IIB6 scFv-Gens wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Not*I geschnitten und die entstandenen Fragmente ligiert (Abb. 5.2). Anschließend wurden elektrokompente *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) mit dem Ligationsansatz via Elektroporation transformiert. Die Trans-

formationseffizienz betrug $7,4 \cdot 10^7$ cfu und entspricht gleichzeitig der maximalen theoretischen Komplexität der erzeugten Antikörpergenbibliothek.

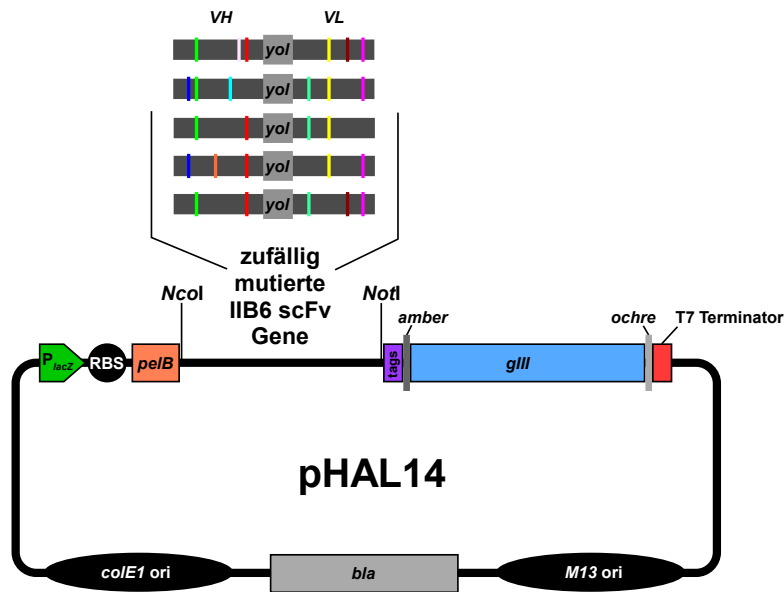


Abb. 5.2: Klonierung der Antikörpergenbibliothek - schematisch

Mittels Zufallsmutagenese randomisierte Gene für IIB6 scFv wurden mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* geschnitten und in den Phagemid-Vektor pHAL14 kloniert.

Um die Güte der Antikörpergenbibliothek abschätzen zu können, wurde nach der Transformation eine Kolonie-PCR von 20 Einzelklonen durchgeführt. Mit Hilfe der Primer MHColE1_f und MHgIII_r1 wurde das mutierte Gen für IIB6 scFv amplifiziert und die DNA im Agarosegel untersucht. Nur Klone, die ein vollständiges Antikörperfragmentgen tragen, zeigten dort eine DNA-Bande im Größenbereich von $\approx 1,3$ kB. Religierte Vektoren, das heißt ohne scFv-Gen-Insert, wiesen jeweils eine DNA-Bande im Bereich von $\approx 0,5$ kB auf. In 9 von 20 untersuchten Einzelklonen wurde das komplette scFv-Gen nachgewiesen. Das bedeutet, dass etwa 45 % aller Klone der Bibliothek ein vollständiges scFv-Gen mit zufälligen Mutationen enthielten. Die 9 amplifizierten Antikörperfragmentgene aus dem vorangegangenen Versuch wurden sequenziert, um eine Abschätzung der erzielten Mutationsrate zu erreichen. Alle 9 Einzelklone enthielten, verglichen mit der Ausgangssequenz, jeweils ≈ 20 Basenaustausche verteilt über den gesamten Bereich des IIB6 scFv-Gens.

Nach der Transformation wurde die Antikörpergenbibliothek mit Hilfe des Helferphagens M13K07 verpackt. Nach Amplifikation und Aufreinigung der Antikörper-Phagen wurde für die Bibliothek ein Phagen-Titer von $4 \cdot 10^{14}$ cfu mL⁻¹ ermittelt.

5.1.2 Bibliothek „B“

Diese Antikörpergenbibliothek wurde mit dem Ziel hergestellt, eine höhere spezifische Mutationsrate (mehr Punktmutationen pro Genkopie) und eine höhere theoretische Komplexität zu

erzielen als bei Bibliothek „A“. Die prinzipielle Vorgehensweise war ähnlich wie bei Bibliothek „A“, jedoch wurde das Gen für IIB6 scFv per *Nested-error-prone*-PCR in insgesamt sieben aufeinander folgenden PCR-Runden amplifiziert und mit Zufallsmutationen versehen. Es kamen dabei drei Primersets zum Einsatz (MH LacZ Pro f + HT-gIII-Beginn1-rev | MKpelB_f + MKmyc_r | IIB6-Aff2-fwd + IIB6-Aff2-rev), die sequenziell verwendet wurden. Da bei der Bibliothekenherstellung die Transformation den limitierenden Schritt für die Komplexität darstellt, wurden hier nach der Ligation insgesamt vier Transformationen durchgeführt. Die Güte der Bibliothek wurde erneut mittels Kolonie-PCR auf den Nachweis vollständiger Antikörperfragmentgene überprüft. Die Mutationsrate wurde durch Sequenzierung der vollständigen IIB6 scFv Genfragmente abgeschätzt. Bibliothek „B“ wurde ebenfalls mit dem Helferphagen M13K07 verpackt und danach für die Pannings verwendet. Die Ergebnisse der Analyse beider Bibliotheken sind in Tab. 5.1 nachfolgend dargestellt.

Tab. 5.1: Übersicht: Antikörpergenbibliotheken

Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse der Bibliothekenvalidierung.

* Anteil von Klonen mit vollständigen scFv-Genfragmenten.

Bibliothek	Runden <i>Error-prone</i> -PCR	Trans- formationen	theoretische Komplexität	Güte*	Ø Mutationsrate (PMs / scFv-Gen)
A	4	1	$7,4 \cdot 10^7$	45 %	≈ 20
B	7	4	$1,8 \cdot 10^8$	25 %	≈ 30

5.2 Affinitätspannings

Zur Selektion von Antikörperfragmenten mit erhöhter Affinität zu MUC1-Peptid wurden mit den erzeugten Genbibliotheken Pannings mit verschiedenen Strategien durchgeführt. Besonderer Wert wurde auf die Anreicherung von Antikörperfragmenten mit einer niedrigen Dissoziationskonstante, d. h. langsame *Off-rate* und einer geringen Neigung zur Ausbildung von Dimeren bzw. Aggregaten gelegt.

5.2.1 *Off-rate*-Panning in Mikrotiterplatten

Das Prinzip des *Off-rate*-Pannings basiert auf der Anreicherung von Antikörperfragmenten, die auf Grund verbesserter Bindungseigenschaften auch harsche, stringente Waschbedingungen überstehen und am Zielmolekül gebunden bleiben. Der Einsatz von größeren Puffervolumina in Kombination mit geringen Mengen Antigen soll die Wahrscheinlichkeit einer Rückbindung der Antikörperphagen an das Antigen reduzieren. Dissoziierte Binder werden beim nächsten Waschschritt entfernt. Durch zeitlich verlängerte Waschschritte wird die Selektion von Antikörperfragmenten mit niedrigen Dissoziationskonstanten verstärkt.

Zur Selektion wurde das Antigen (MUC1-Peptid (15 AS Cys)) in verschiedenen Mengen (je 1×1 ng, 10 ng, 100 ng pro Kavität) in einem Maxisorp Mikrotiterplatten-Streifen (Nunc) immobi-

lisiert. Aus der Antikörpergenbibliothek „A“ wurden pro Vertiefung jeweils $4 \cdot 10^{10}$ Phagenpartikel inkubiert. Nach mehreren Waschschritten im ELISA-Washer wurde der Mikrotiterplatten-Streifen in 2 L PBS für eine Woche bei 4 °C gelagert. Es folgten weitere Waschschriffe im ELISA-Washer und insgesamt zwei weitere Wochen Inkubation in 1 L PBS bei 4 °C. Nach Abschluss der gesamten Waschprozedur konnten nach Elution der noch gebundenen Phagen folgende Titer ermittelt werden: 1 ng MUC1: 29 cfu | 10 ng MUC1: 74 cfu | 100 ng MUC1: 81 cfu.

Von den insgesamt 184 erhaltenen Einzelklonen wurden 92 im Mikrotiterplatten-Maßstab kultiviert und lösliche scFv-Fragmente produziert. Die gewonnenen Zellüberstände enthielten einen Großteil der Antikörperfragmente und wurden in einem Antigen-ELISA auf Bindung zu MUC1-Peptid (15 AS Cys) getestet. 29 der 92 getesteten Klone zeigten ein Signal $>0,2$ im ELISA (grüne Balken in Abb. 5.3). Diese Klone wurden mittels Kolonie-PCR (Primer: MH LacZ Pro_f, MHgIII_r1) auf vollständige scFv-Genfragmente überprüft. Aliquots der PCR-Ansätze wurden im Agarosegel analysiert, dabei konnte bei 28 von 29 Klonen eine DNA-Bande, die einem kompletten scFv-Gen entsprach, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

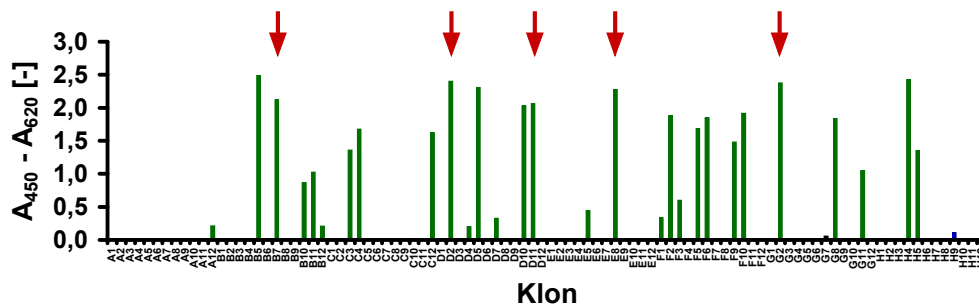


Abb. 5.3: ELISA: Off-rate-Panning

Jede Vertiefung wurde mit 1 µg MUC1-Peptid (15 AS Cys) beschichtet. Nach der Produktion von löslichen scFv der Einzelklone wurden 20 µL des Kulturüberstands mit 80 µL Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB. Klone für die weitere Validierung sind mit einem roten Pfeil markiert, die Positivkontrollen (IIB6 scFv) sind durch blaue Balken gekennzeichnet.

Die in der Kolonie-PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden aufgereinigt und mit Hilfe der Primer MKpelB_f und MKmyc_r wurden die Gene der leichten und schweren Kette der scFv-Fragmente sequenziert. Eine bioinformatische Analyse der erhaltenen Sequenzinformationen erfolgte unter Zuhilfenahme der Datenbank VBASE2. Die Gensequenzen für die leichte und schwere Kette wurden separat ausgewertet und jeweils mit der Originalsequenz des Ausgangsklons IIB6 scFv verglichen. Ein *Alignment* der Aminosäuresequenzen ergab, dass sich alle 28 Klone durch verschiedene Punktmutationen von IIB6 scFv unterschieden und innerhalb der 28 Kandidaten keine Duplikate vorlagen. Für weitere Analysen wurden fünf Klone mit hohen ELISA-Signalen (HT186: B7, D2, D11, E8, G2) ausgewählt.

Um eine Abschätzung zu treffen, ob sich die Expressionsraten der Affinitätskandidaten-scFv signifikant von der des Ausgangsklons IIB6 unterschieden, wurde der Kulturüberstand jedes Klons in einem Proteingel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend

wurden die scFv-Fragmente über das c-myc-Epitop in einer Immunfärbung spezifisch angefärbt (Abb. 5.4).

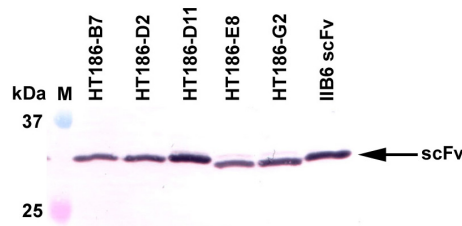


Abb. 5.4: Western-Blot: Kulturüberstände *Off-rate*-Panning

Pro Spur wurden je 8 μ L Kulturüberstand in ein 12 %iges SDS-PAA-Gel geladen. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte ein Western-Blot (Elektro-Blot) auf PVDF-Membran. Der Nachweis der scFv erfolgte mit einer Immunfärbung über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) AP-Konjugat, Substrat: NBT/BCIP. Für alle Klone konnte eine spezifische Bande im Größenbereich von ≈ 30 kDa gezeigt werden.

Für den Klon HT186-D11 wurde eine leicht erhöhte Expressionsrate in Form einer stärkeren scFv-Bande nachgewiesen. Die übrigen Klone wiesen Bandenintensitäten ähnlich dem Ursprungsklon IIB6 scFv auf.

5.2.2 Panning in Lösung

Bei herkömmlichen Pannings wird das Antigen üblicherweise an eine Kunststoffoberfläche immobilisiert. Hierbei kann es nach der Beschichtung, auch bei Verwendung von niedrig konzentrierten Antigenlösungen, zu Bereichen mit erhöhter Antigendichte kommen. Die Selektion von Antikörperfragmenten, die zu erhöhter Dimer- beziehungsweise Aggregatbildung neigen, kann dadurch begünstigt werden. Um diesem Problem zu begegnen, wurden Pannings in Lösung durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst keine Immobilisierung des Antigens, sondern dieses lag frei in Lösung vor. Nach Inkubation einer Antikörperphagen-Bibliothek mit biotinyliertem MUC1-Peptid (32 AS) wurden gebundene Antikörperphagen mittels Streptavidin-*Beads* aus der Lösung isoliert. Durch schrittweise Reduktion der Antigenkonzentration in sequenziellen Panning-Runden konnten Antikörperfragmente mit verbesserter Affinität zum Antigen isoliert werden.

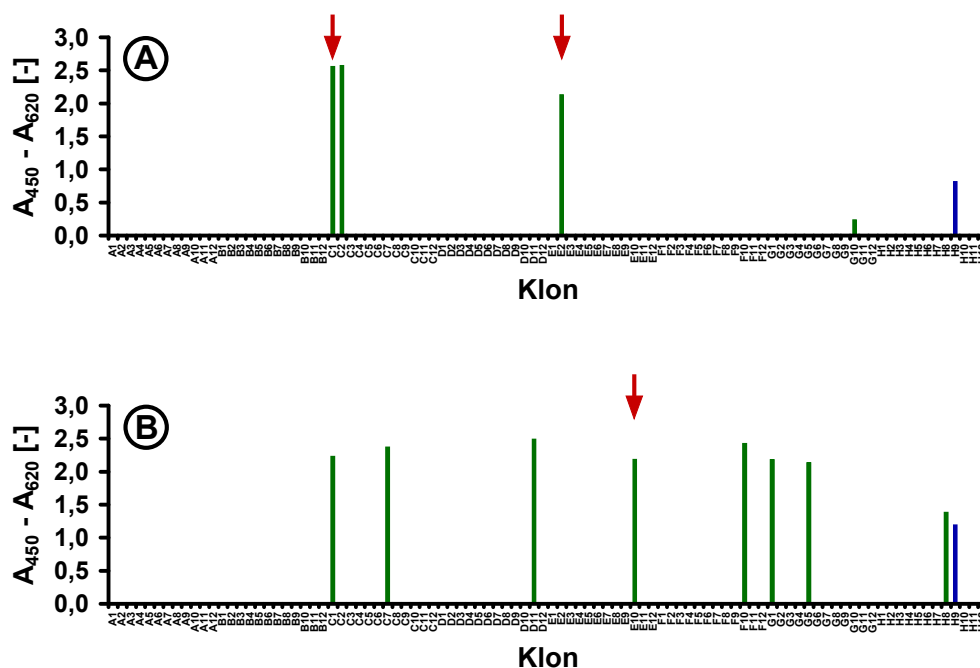
In diesem Versuch wurde die Bibliothek „B“ verwendet. Vor der eigentlichen Selektion wurde die Bibliothek auf geblockten (2 % Milchpulver, 2 % BSA in PBS-T (0,1 %)) Streptavidin-*Beads* (Invitrogen) präinkubiert. Dieser Schritt diente zur Abreicherung von unspezifisch und Streptavidin-bindenden Antikörperphagen. Anschließend wurden $1 \cdot 10^{13}$ cfu Antikörperphagen mit 60 nM MUC1-Peptid (32 AS Biotin) für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte das Fangen von MUC1-gebundenen Antikörperphagen durch Zugabe von $6,5 \cdot 10^7$ Streptavidin-*Beads*. Nach 10 Waschschritten wurden die gebundenen Phagen von den *Beads* eluiert und ein Titer von $1,73 \cdot 10^6$ cfu ermittelt. Diese Antikörperphagen dienten zur Erstellung einer neuen Phagenpräparation für eine weitere Panning-Runde. Insgesamt wurden vier Panning-Runden mit sukzessiv reduzierter Antigen-Konzentration durchgeführt (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Panning in Lösung

Auflistung aller Ergebnisse und Parameter der vier Panning-Runden in Lösung

Panning-Runde	eingesetzte AK-Phagen [cfu]	MUC1-Peptid (32 AS Biotin) Konzentration [nM]	SA-Beads	Beadinkubation [min]	eluierte Phagen [cfu]
1	$1 \cdot 10^{13}$	60	$6,50 \cdot 10^7$	15	$1,73 \cdot 10^6$
2	$1 \cdot 10^{12}$	5	$3,25 \cdot 10^7$	10	$4,05 \cdot 10^5$
3	$1 \cdot 10^{12}$	0,5	$3,25 \cdot 10^7$	5	$3,9 \cdot 10^5$
4	$1 \cdot 10^{12}$	0,1	$3,25 \cdot 10^7$	5	$5 \cdot 10^6$

Nach Abschluss des Pannings wurden aus der dritten und vierten Panning-Runde jeweils 184 Einzelklone (insgesamt 368) in Mikrotiterplatten kultiviert und zur Produktion von löslichen scFv-Fragmenten verwendet. Die erhaltenen Zellüberstände wurden im Antigen-ELISA auf Bindung an MUC1-Peptid (32 AS Cys) untersucht. Auffällig war, dass keine scFv-Fragmente, die aus der vierten Panning-Runde isoliert wurden, an das Antigen banden. Die Resultate der ELISAs der dritten Panning-Runde sind in Abb. 5.5 dargestellt.

**Abb. 5.5: ELISA: Panning in Lösung**

Jede Vertiefung wurde mit $1 \mu\text{g}$ MUC1-Peptid (32 AS Cys) beschichtet. Nach der Produktion von löslichen scFv der Einzelklone wurden $20 \mu\text{L}$ des Kulturüberstandes mit $80 \mu\text{L}$ Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Pro Platte wurden je 92 Klone untersucht. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB. Klone für die erste Validierung (Sequenzierung, Western Blot) sind mit grün markiert, Klone für weitere Charakterisierungen sind mit einem roten Pfeil markiert, die Positivkontrollen (IIB6) werden durch blaue Balken repräsentiert. Dargestellt sind ausschließlich die Resultate von Einzelklonen aus der dritten Panning-Runde.

Nach der Produktion wurden die Zellüberstände der ELISA-positiven Einzelklone zur Abschätzung der Expressionsraten mittels Western-Blot und anschließender Immunfärbung untersucht (Abb. 5.6). Der Aufbau des Versuchs war dem im Abschnitt 5.2.1 identisch.

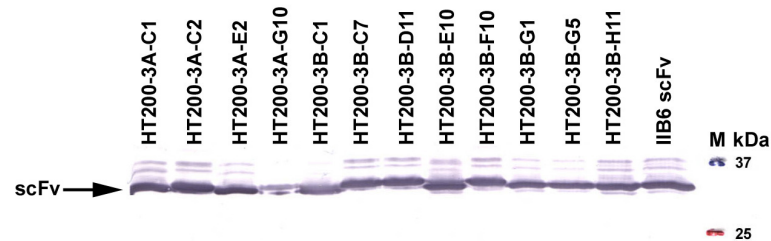


Abb. 5.6: Western-Blot: Kulturüberstände Panning in Lösung

Pro Spur wurden je 8 μ L Kulturüberstand in ein 12 %iges SDS-PAA-Gel geladen. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte ein Western-Blot (Elektro-Blot) auf PVDF-Membran. Der Nachweis der scFv-Fragmente erfolgte mit einer Immunfärbung über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) AP-Konjugat, Substrat: NBT/BCIP. Für alle Klone konnte eine spezifische Bande im Größenbereich von \approx 30 kDa gezeigt werden.

Die scFv-Gene aller Einzelklone mit einem ELISA-Signal $>0,2$ (grüne Balken) wurden sequenziert und die Sequenzen mittels VBASE2 bioinformatisch ausgewertet. Die Klone HT200: 3A-C1, 3A-E2 und 3B-E10 wiesen unterschiedliche Aminosäuresequenzen auf. Die Übrigen waren sequenzidentische Kopien der genannten Klone. Die Klone HT200: 3A-G10, 3B-C1, 3B-C7 und 3B-H8 konnten nicht erfolgreich sequenziert werden. Aus diesem Panning wurden drei verschiedene Einzelklone (Markierung: roter Pfeil in Abb. 5.5) für die weitere Charakterisierung gewonnen.

5.2.3 Kompetitives Panning in Lösung

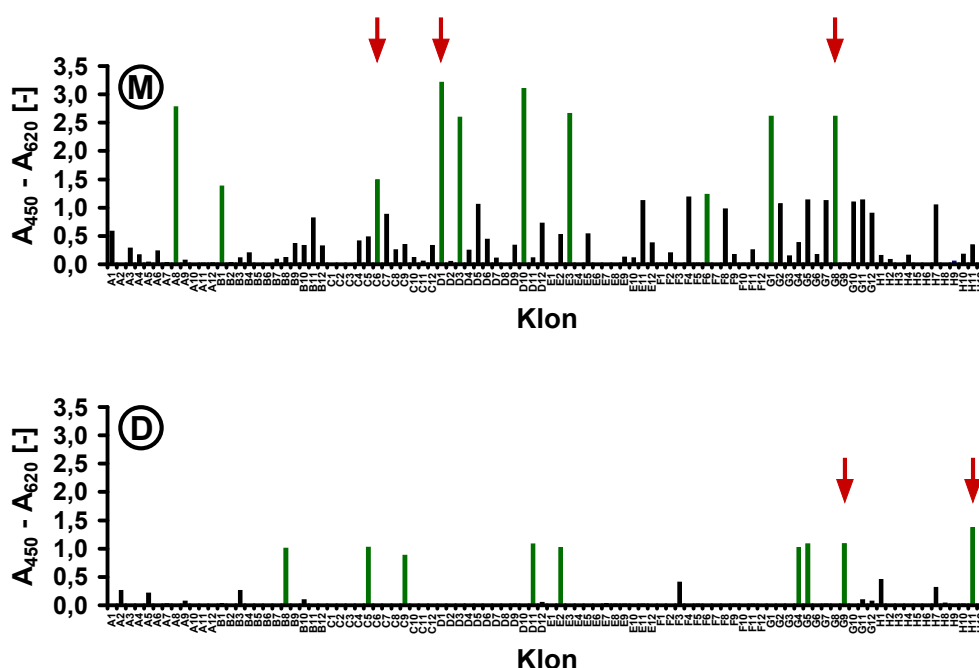
Bei einem Panning in Lösung kann durch die Zugabe eines Bindungskompetitors der Selektionsprozess beeinflusst und die Wahrscheinlichkeit der Anreicherung von Bindern mit niedrigen Dissoziationskonstanten erhöht werden. Es wurde die dritte Panning-Runde aus dem vorangegangenen Versuch wiederholt, jedoch wurden in zwei verschiedenen Ansätzen entweder unmarkiertes Antigen (MUC1-Peptid (32 AS) oder ein löslicher α -MUC1-scFv (HT186-D11) als Kompetitor eingesetzt. Zunächst wurden je Ansatz $1 \cdot 10^{12}$ cfu Antikörperphagen (vgl. 3. Panning-Runde Abschnitt 5.2.2) mit je 1 nM MUC1-Peptid (32 AS Biotin) für 2 h inkubiert. Anschließend wurde ein 1000facher Überschuss an Kompetitor (MUC1-Peptid (32 AS) oder HT1861-D11 scFv) zugegeben und sieben Tage bei 4 °C inkubiert (Tab. 5.3). In dieser Zeit bildete sich ein Bindungsgleichgewicht in der Lösung aus. Jeder dissoziierte Antikörperphage hatte bei diesem Verfahren nahezu keine Chance, erneut ein biotinyliertes MUC1-Peptid-Molekül zu binden. Nach einem Fang-Schritt mit Streptavidin-*Beads* wurden Antikörperphagen abgetrennt, die theoretisch den gesamten Selektionsprozess über an biotinyliertes MUC1-Peptid gebunden vorlagen.

Tab. 5.3: Kompetitives Panning in Lösung

Auflistung der Parameter und Ergebnisse der kompetitiven Pannings in Lösung. Nicht gelistete Parameter sind identisch mit denen der 3. Panning-Runde in Tab. 5.2

Kompetitor	Konzentration Kompetitor [μM]	Überschuss	MUC1-Peptid (32 AS Biotin) [nM]	Gleichgewicht [d]	eluierte Phagen [cfu]
MUC1-Peptid (32 AS)	1	1000×	1	7	$1,44 \cdot 10^7$
HT186-D11 scFv	1	1000×	1	7	$1,26 \cdot 10^6$

Aus beiden Pannings wurden jeweils 92 Einzelklone in Mikrotiterplatten zur Produktion von löslichen scFv-Fragmenten verwendet. Die Zellüberstände wurden im Antigen-ELISA auf Bindung an MUC1-Peptid (32 AS Cys) untersucht (Abb. 5.7).

**Abb. 5.7: ELISA: Kompetitives Panning in Lösung**

„M“ = Konkurrenz mit MUC1-Peptid (32 AS), „D“ Konkurrenz mit HT186-D11 scFv. Jede Vertiefung wurde mit 100 ng MUC1-Peptid (32 AS Cys) beschichtet. Nach der Produktion von löslichen scFv der Einzelklone wurden 20 μL des Kulturüberstands mit 80 μL Block-Puffer gemischt und im Antigen-ELISA getestet. Pro Platte wurden je 92 Klone untersucht. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB. Klone für die erste Validierung (Sequenzierung, Western Blot) sind grün markiert, Klone für weitere Charakterisierungen sind mit einem roten Pfeil markiert, die Positivkontrollen (IIB6) werden durch blaue Balken repräsentiert.

Nach der Produktion wurden die Zellüberstände der Klone mit einem positiven ELISA-Signal zur Abschätzung der Expressionsraten mittels Western-Blot und anschließender Immunfärbung untersucht (Abb. 5.8). Der Aufbau des Versuchs war mit dem im Abschnitt 5.2.1 identisch.

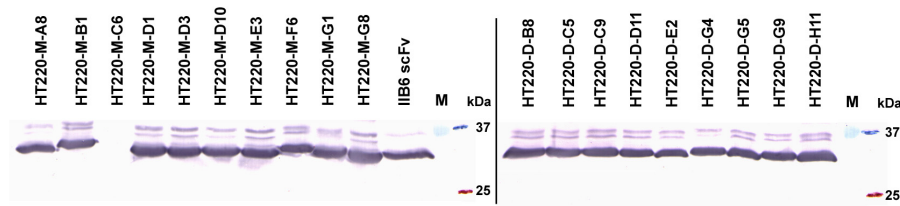


Abb. 5.8: Western-Blot: Kulturüberstände kompetitives Panning in Lösung

Pro Spur wurden je 8 μ L Kulturüberstand in ein 12 %iges SDS-PAA-Gel geladen. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte ein Western-Blot (Elektro-Blot) auf PVDF-Membran. Der Nachweis der scFv-Fragmente erfolgte mit einer Immunfärbung über Maus- α -c-my- IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) AP-Konjugat, Substrat: NBT/BCIP. Für alle Klone außer HT220-M-C6 konnte eine spezifische Bande im Größenbereich von \approx 30 kDa gezeigt werden.

Die scFv-Gene der untersuchten Einzelklone wurden sequenziert und die Sequenzen mittels VBASE2 ausgewertet. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen führte zu fünf verschiedenen scFv-Varianten (rote Pfeile in Abb. 5.7). Abschließend sind die Einzelklone aufgelistet (Tab. 5.4), die für weitere Charakterisierungen herangezogen wurden.

Tab. 5.4: Übersicht: Einzelklone für die weitere Charakterisierung

Auflistung der mit drei unterschiedlichen Panning-Methoden isolierten Einzelklone für die weitere Validierung der Bindungseigenschaften zu MUC1

Einzelklon	Panning-Methode
HT186-B7	<i>Off-rate</i>
HT186-D2	<i>Off-rate</i>
HT186-D11	<i>Off-rate</i>
HT186-E8	<i>Off-rate</i>
HT186-G2	<i>Off-rate</i>
HT200-3A-C1	in Lösung
HT200-3A-E2	in Lösung
HT200-3B-E10	in Lösung
HT220-M-C6	in Lösung + Konkurrenz (MUC1)
HT220-M-D1	in Lösung + Konkurrenz (MUC1)
HT220-M-G8	in Lösung + Konkurrenz (MUC1)
HT220-D-G9	in Lösung + Konkurrenz (HT186-D11)
HT220-D-H11	in Lösung + Konkurrenz (HT186-D11)

5.3 ELISA mit titrierten Kulturüberständen

Um eine Einschätzung der erhaltenen α -MUC1 scFv-Fragmente hinsichtlich ihrer Produktions- und Bindungseigenschaften treffen zu können, wurde ein ELISA mit titrierten Kulturüberständen durchgeführt. Die Intensität der ELISA-Signale entsprechen dem Resultat der Summe der Faktoren Affinität und Produzierbarkeit. Die Produktionseigenschaften der Klone wurden bereits nach dem Panning per Western-Blot abgeschätzt und entsprachen größtenteils denen vom IIB6 scFv. Somit kann anhand des Titrations-ELISAs bereits auf mögliche Affinitätsverbesserungen

rückgeschlossen werden. Zunächst wurden lösliche scFv aller Einzelklone (inkl. IIB6 scFv) neu im Mikrotiterplatten-Maßstab produziert. Von den Kulturüberständen wurden unterschiedlich starke Verdünnungen (mit PBS) hergestellt und die verdünnten Lösungen im Antigen-ELISA auf Bindung an MUC1-Peptid (32 AS Cys) untersucht (Abb. 5.9).

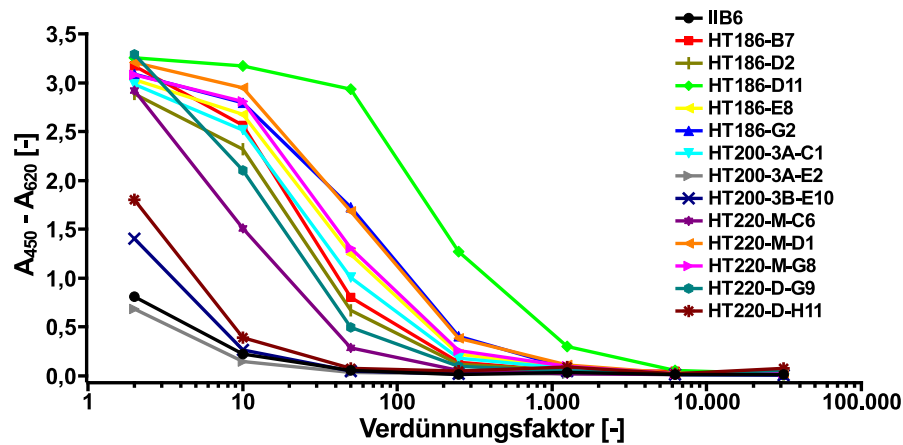


Abb. 5.9: ELISA mit titrierten Kulturüberständen

Jede Vertiefung wurde mit 50 ng MUC1-Peptid (32 AS Cys) beschichtet. Nach der Produktion von löslichen scFv-Fragmenten der Einzelklone wurden die jeweiligen Verdünnungsstufen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB.

Das ELISA-Signal des Ausgangsklons IIB6 scFv fiel bereits bei geringen Verdünnungsstufen ab. Ähnliche Signalverläufe wie beim IIB6 scFv konnten bei drei affinitätsgereiften Kandidaten beobachtet werden. Die Signale des Klons HT186-D11 fielen im Vergleich mit den übrigen Klonen erst bei höheren Verdünnungen ab. Dies kann mit einer bereits im Western-Blot beobachteten (vgl. Abb. 5.4), verbesserten Produzierbarkeit in Zusammenhang gebracht werden. Eine erste Abschätzung ließ bei einem Großteil der untersuchten Klone auf eine verbesserte Affinität zum MUC1-Peptid (32 AS Cys) schließen.

5.4 Oberflächenplasmonresonanz-Analysen mit Kulturüberständen zwecks Affinitäts-Ranking

Um eine Rangfolge der affinitätsgereiften MUC1-Binder zu erstellen, wurden mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) die Bindungscharakteristiken der scFv-Fragmente bestimmt. Dieses Verfahren erlaubte die direkte Betrachtung des Assoziations- und Dissoziationsverlaufs von Bindungsereignissen.

Kulturüberstände mit löslich produzierten scFv-Fragmenten der Kandidaten wurden verdünnt und deren Bindung an immobilisiertes MUC1-Peptid (32 AS Cys) untersucht (Abb. 5.10). Die Assoziationsphase startete bei $t = 150$ s und endete bei $t = 330$ s, die direkt folgende Dissoziationsphase betrug 450 s.

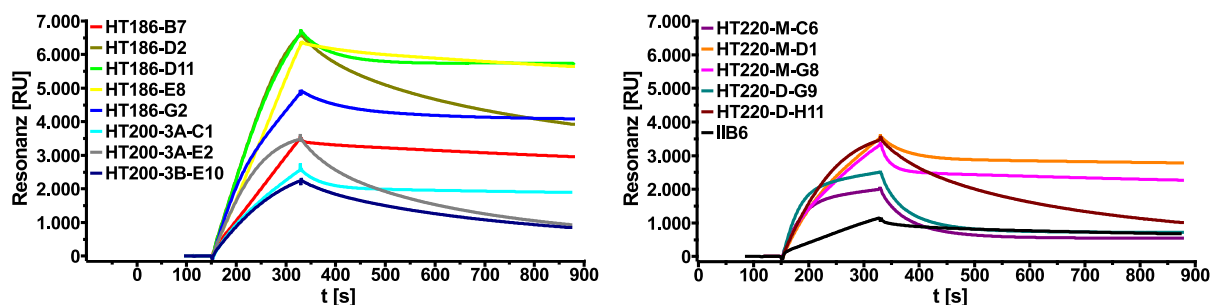


Abb. 5.10: SPR-Analysen mit Kulturüberständen

Verdünnte (1:10) Kulturüberstände wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz auf Bindung an MUC1-Peptid (32 AS Cys) untersucht. Ca. 750 RU MUC1-Peptid wurden per Thiol-Kopplung an einen CM5-Chip kovalent gekoppelt. Dargestellt sind die MUC1-Messkurven nach Abzug der Messsignale der Referenz-Messzelle (900 RU SHERK2-Peptid). Je Klon wurden 90 μL Kulturüberstand mit einer Flussrate von $30 \mu\text{L min}^{-1}$ appliziert. Assoziation: 150 - 330 s; Dissoziation: 330 - 880 s.

Die Assoziationskurven aller affinitätsgereiften Klone wiesen im Vergleich mit IIB6 scFv eine steilere Steigung und ein höheres absolutes Messsignal am Ende der Assoziationsphase auf. Dies deutet auf eine verbesserte Erkennung und Bindung an MUC1 hin. Für die Festlegung der Rangfolge der Klone war jedoch der Verlauf des Messsignals in der Dissoziationsphase ausschlaggebend. Der Verlauf beschreibt, mit welcher Geschwindigkeit die Bindung zwischen den beiden Bindungspartnern zerfällt. ScFv-Fragmente, deren Dissoziationskurven eine stärkere negative Steigung, verglichen mit IIB6 scFv (schwarze Linie), aufwiesen (HT186-D2, HT186-E8, HT200-3A-E2, HT200-3B-E10, HT220-M-C6, HT220-D-G9 und HT220-D-H11), wurden für weitere Charakterisierungen nicht verwendet. Weiter untersucht wurden die Klone HT186-B7, HT186-D11, HT186-G2, HT200-3A-C1, HT220-M-D1 und HT220-M-G8.

5.5 Produktion und Aufreinigung

Die bisherigen Versuche erfolgten stets mit löslichen scFv in Kulturüberständen aus Produktionen im Mikrotiterplatten-Maßstab. Für eine erste Abschätzung der Bindungseigenschaften und zur Erstellung einer Rangfolge war die Qualität der nicht aufgereinigten Überstände ausreichend. Um eingehendere Untersuchungen durchzuführen, war es erforderlich, größere Mengen aufgereinigter scFv-Fragmente herzustellen.

Bislang erfolgte die Expression der scFv-Gene direkt von den korrespondierenden Phagemid-Vektoren (pHAL14) aus. Für die periplasmatische Produktion ausreichender Mengen ($\approx 1 \text{ mg}$) Zielprotein in *E. coli* war die Umklonierung der scFv-Gene in den prokaryotischen Expressionsvektor pOPE101-XP nötig. Dieser Vektor ist speziell für die periplasmatische Expression von Antikörperfragmenten entwickelt worden (Schmiedl *et al.*, 2000b). Die scFv-Gene wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* aus den Phagemid-Vektoren herausgeschnitten (vgl. Abb. 5.2) und in den ebenfalls mit *NcoI* und *NotI* geschnittenen Vektor pOPE101-XP li-

giert. Die Konstrukte wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF' transformiert. Zur Kontrolle wurden in den neuen Konstrukten die DNA-Abschnitte der klonierten scFv-Gene sequenziert.

Mit den in den Expressionsvektor pOPE101-XP umklonierten Affinitätskandidaten erfolgte die Produktion löslicher scFv-Fragmente im 1 L Maßstab. 3×330 mL Kultur wurden pro Klon in Schüttelkolben kultiviert. Die Expression der Antikörper-Fragmente wurde mittels IPTG-Zugabe (50 μ M) induziert. Nach drei Stunden Produktionsphase wurden die Zellen abgetrennt und mit ihnen eine Periplasma-Präparation durchgeführt. Die gewonnenen periplasmatischen Extrakte wurden dialysiert und die enthaltenen scFv-Fragmente per IMAC aufgereinigt. Stellvertretend für alle Varianten sind die Ergebnisse der Produktion und der Aufreinigung von HT186-D11 in Abb. 5.11 beispielhaft angeführt. Für alle weiteren Einzelklone sind die Ergebnisse der Produktion und Aufreinigung im Anhang (A.1) angeführt.

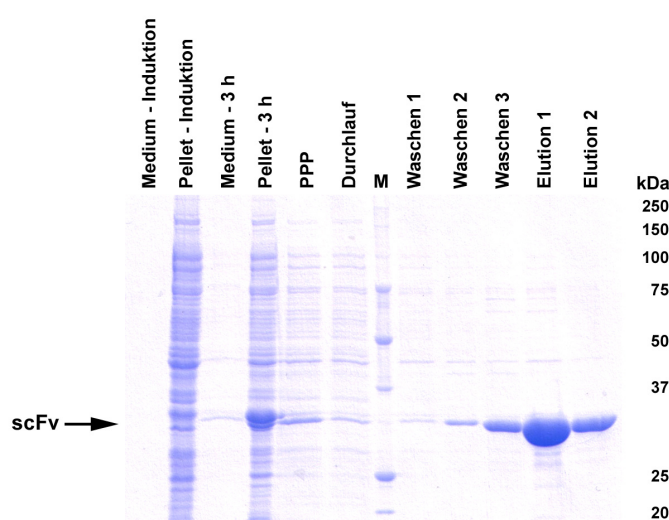


Abb. 5.11: Produktion und Aufreinigung von HT186-D11 scFv

Während der Produktion und Aufreinigung wurde von allen Fraktionen ein 100 μ L Aliquot entnommen und auf einem 12 %igen SDS-PAA Gel aufgetrennt. M = molekularer Massenstandard. Die Protein-Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R250. Pro Spur wurden 8 μ L Probe geladen. In Elution 1 lag das Zielprotein mit einer Reinheit >90 % vor.

Die Elutionsfraktionen 1 und 2 enthielten den Großteil der scFv-Proteine und wurden bis zur weiteren Verwendung in 250 μ L Aliquots bei -80 °C (ohne Schutzprotein) gelagert.

5.5.1 Quantifizierung der aufgereinigten scFv-Fragmente

Für den Einsatz definierter scFv-Mengen in weiteren Experimenten war es erforderlich, eine Proteinquantifizierung der aufgereinigten scFv-Fragmente durchzuführen. Dies geschah über eine densitometrische Auswertung Coomassie-gefärbter Proteinbanden im SDS-PAA Gel. Die Bandenintensitäten verschiedener Verdünnungen der jeweiligen Elution 1 Fraktionen wurden mit einem scFv-Standard (TM44-C7.3) verglichen. Grundlage dieser Methode ist die Tatsache, dass

die Bandenintensität Coomassie gefärbter Proteinbanden in einem bestimmten Konzentrationsbereich (bei scFvs: 10 - 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) linear verläuft. Durch den Vergleich mit dem definierten internen Standard kann das Zielprotein quantifiziert werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass noch in der Probe enthaltene Verunreinigungen (z. B. Peptide, kleine Proteinbruchstücke) keinen verfälschenden Einfluss auf das Messergebnis ausüben. Die aufgereinigten scFv-Fragmente wurden quantifiziert (vgl. Tab. 5.5) und für alle weiteren Charakterisierungen verwendet.

Tab. 5.5: Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten scFv Fragmente

Anhand der Konzentration in Elution 1 (El. 1) kann über das Elutionsvolumen auf die Proteinausbeute pro Liter Kulturvolumen geschlossen werden. Da die Konzentrationsbestimmung nur für Elution 1 vorgenommen wurde, jedoch Elution 2 und die Waschfraktionen ebenfalls geringfügig Zielprotein enthalten, sind die Werte der Ausbeuten mit einem $>$ versehen.

scFv	Konzentration in El. 1 [mg mL^{-1}]	Volumen El. 1 [mL]	Ausbeute scFv/Kulturvolumen [mg L^{-1}]
IIB6	1,09	2	$>2,2$
HT186-B7	0,49	5	$>2,5$
HT186-D11	1,45	2	$>2,9$
HT186-G2	0,42	2	$>0,8$
HT200-3A-C1	0,80	2	$>1,6$
HT220-M-D1	0,79	2	$>1,6$
HT220-M-G8	1,60	2	$>3,2$

5.6 ELISA mit aufgereinigten scFv-Fragmenten

Ein ELISA, bei dem eine Verdünnungsreihe mit definierten scFv-Konzentrationen zum Einsatz kommt, erlaubt eine Abschätzung der Affinität der verwendeten scFv-Fragmente. Beim Vergleich der erhaltenen ELISA-Signale ist auf Grund des Einsatzes gleicher Konzentrationen an verwendeten scFv-Fragmenten deren Affinität für die Signalintensität ausschlaggebend.

Alle affinitätsgereiften Kandidaten zeigten im Vergleich mit dem original IIB6 scFv einen signifikanten Anstieg des ELISA-Signals bei geringen Proteinkonzentrationen (Abb. 5.12). Bereits mit Proteinkonzentrationen, die bis zum Faktor 50 unter der des IIB6 scFv lagen, wurden für die affinitätsgereiften α -MUC1 scFv-Fragmente ähnlich hohe ELISA-Signale wie für IIB6 scFv nachgewiesen. Der Großteil der Kandidaten zeigte einen sehr ähnlichen Verlauf der ELISA-Signale, einzig die Messkurven von HT186-G2 und HT220-M-D1 wichen leicht von denen der anderen Klone ab. Für kein scFv-Fragment wurde eine Bindung an BSA verzeichnet. Das Ergebnis dieses Versuchs lässt eine signifikante Affinitätssteigerung bei allen Kandidaten vermuten. Eine erste Abschätzung deutet auf durchschnittliche Verbesserung der Antigenbindung im ELISA um den Faktor ≈ 25 hin.

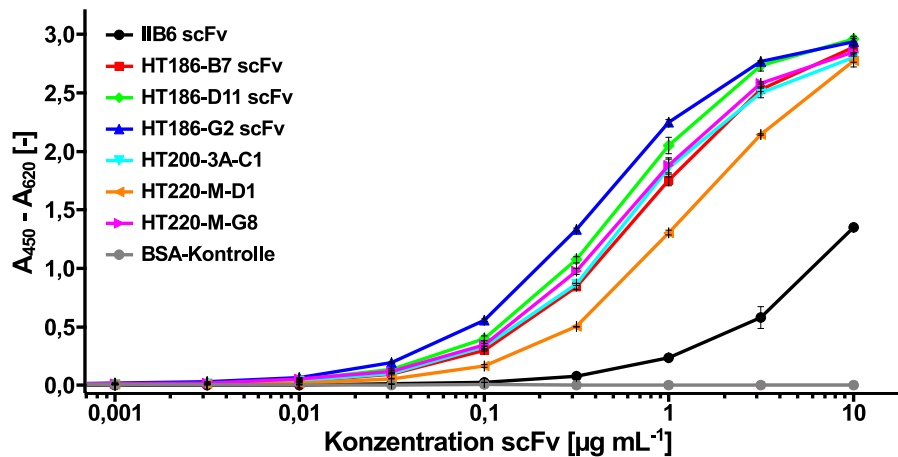


Abb. 5.12: ELISA mit definierten scFv Konzentrationen (Verdünnungsreihe)

Die Vertiefungen der MTP wurden mit 50 ng MUC1-Peptid (32 AS Cys) bzw. 100 ng BSA beschichtet. Nach der Aufreinigung der löslichen scFv der Einzelklone wurden Verdünnungsreihen erstellt und inkubiert. Die BSA-Kontrolle ist beispielhaft für den Klon HT186-D11 angeführt. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB.

5.7 Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz

Die Affinitäten der untersuchten Antikörperfragmente zu MUC1-Peptid (15 AS Cys) wurden mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) untersucht. Diese Methode erlaubt es, den kinetischen Bindungsverlauf zwischen Antikörper und MUC1-Peptid zu verfolgen. Das Messsignal resultiert aus der Massezunahme nach Bindung des Antikörpers an das immobilisierte Antigen. Das gesamte Verfahren ist *label-free* und benötigt keine weiteren Nachweisreagenzien. Anhand der erhaltenen Bindungskinetiken können anschließend die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten (K_D) der Bindung ermittelt werden. Das MUC1-Peptid enthält am C-Terminus ein endständiges Cystein, welches die kovalente Kopplung des Peptids mittels Thiolkopplung an die Oberfläche eines CM5-Chips ermöglicht. Alle Messungen wurden in einer Biacore2000 Apparatur durchgeführt.

Die IMAC aufgereinigten scFv-Fragmente wurden in PBS-T (0,005 % Tween20) auf definierte Konzentrationen verdünnt. Die Proteinlösungen wurden in das Messsystem injiziert und 300 s durch die Messzelle geleitet, gefolgt von einer Dissoziationsphase von 600 s. Die Messungen erfolgten referenziert, das heißt, es wurde ein für alle α -MUC1-Binder unspezifisches Peptid (SHERK2) in einer Referenzmesszelle gekoppelt, um Puffereffekte und unspezifische Wechselwirkungen zwischen Probe und Messzelle zu kompensieren. Die Messwerte aus dieser Zelle wurden direkt von den Werten der eigentlichen MUC1-Messzelle abgezogen. Die resultierenden Sensogramme sind für den Antikörper HT186-D11 beispielhaft in Abb. 5.13 dargestellt (die Sensogramme aller übrigen Messungen finden sich im Anhang). Der schnelle Abfall des Messsignals zu Beginn der Dissoziationsphase lag in Inhomogenitäten der Proben begründet. Zur Kompensation dieses Effektes wurde in das mathematische Berechnungsmodell (Langmuir 1:1) ein zusätzlicher Term für einen verstärkten *bulk*-Effekt eingebracht (gemäß BIAevaluation Software Handbook).

Bei kinetischen Messungen mit R_{\max} -Werten >200 kann es während der Dissoziationsphase zu Massetransfereffekten kommen, die die Messungen eventuell verfälschen. Deshalb wurden die drei Proben mit höheren R_{\max} -Werten auf einem weiteren Chip, an den weniger MUC1-Peptid gekoppelt wurde, vermessen. Ein Vergleich der K_D -Werte aus beiden Messungen zeigte jedoch nur geringe Abweichungen, die unter Berücksichtigung der bereits erwähnten Effekte vernachlässigbar waren. Die Ergebnisse aller Messungen (berechnete Bindungsparameter) sind in Tab. 5.6 aufgelistet. Für den Klon HT186-D11 konnte bei Messungen auf zwei verschiedenen Chips jeweils die stärkste Affinität zum MUC1-Peptid (15 AS Cys) ermittelt werden.

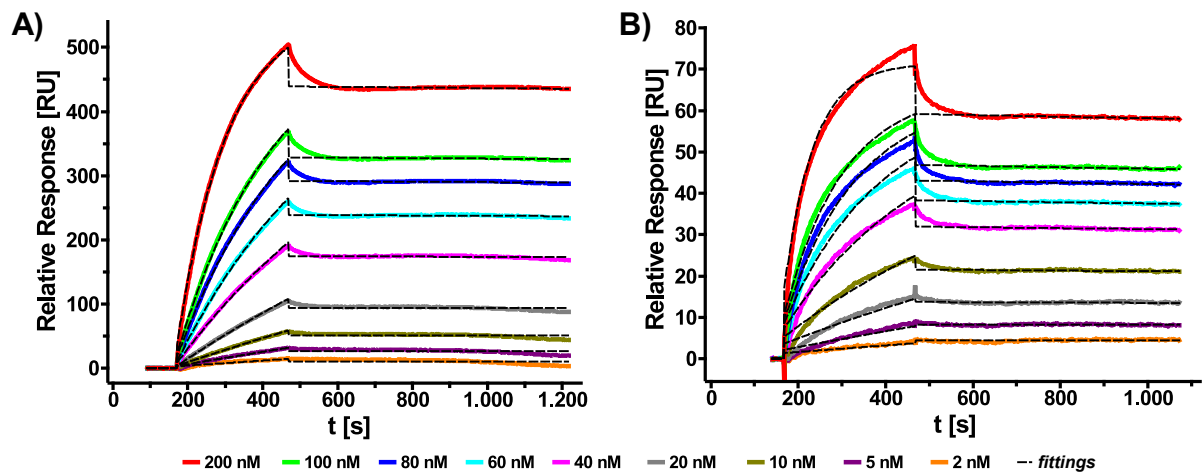


Abb. 5.13: Affinitätsbestimmung mittels Oberflächenplasmonresonanz für HT186-D11

Dargestellt sind die Sensogramme für die kinetischen Messungen von HT186-D11 auf 47 RU (A) und 10 RU (B) MUC1-Peptid (15 AS Cys). Die theoretischen Kurvenverläufe des mathematischen *fittings* (Langmuir 1:1) sind gestrichelt gekennzeichnet. Die „Ecken“ in den *Fittings* zu Beginn der Dissoziationsphase resultieren aus der Modifikation des mathematischen Auswertungsmodells. Alle Messungen erfolgten auf CM5-Chips mit einer Flussrate von $50 \mu\text{L min}^{-1}$. Die Konzentration 10, 40 und 80 nM scFv wurden als Duplikat (nicht dargestellt) vermessen. Zur Regeneration der Messzelle wurden 50 mM HCl eingesetzt.

Tab. 5.6: Bestimmung der Affinität der scFv-Fragmente zum MUC1-Peptid

Auflistung der Bindungsparameter der untersuchten Antikörper. Die für die Beschreibung der Affinität übliche Kenngröße ist die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D .

* Kinetische Auswertung der Messdaten nicht möglich, stattdessen erfolgte die Auswertung mittels *steady-state*-Modell.

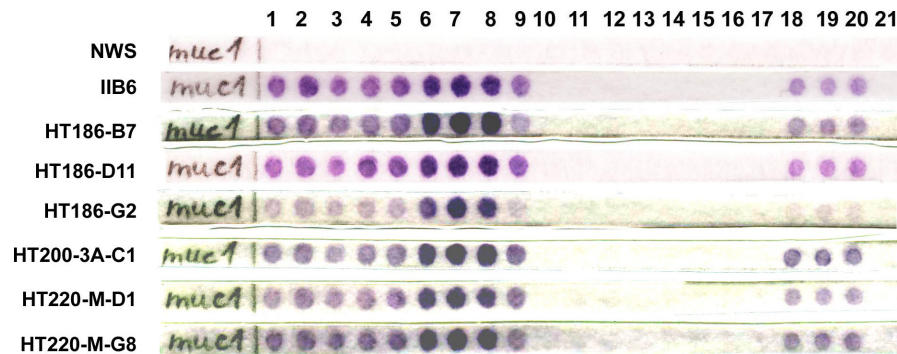
Chip 1 - 47 RU MUC1-Peptid (15 AS Cys)						
Antikörperfragment	k_a [1/M·s]	k_d [1/s]	R_{max} theor.	K_A [1/M]	K_D [M]	χ^2
IIB6*	-	-	41	$3,2 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^{-7}$	1,2
HT186-B7	$3,5 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^{-5}$	519	$7,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^{-9}$	7,0
HT186-D11	$3,8 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	519	$1,8 \cdot 10^9$	$5,7 \cdot 10^{-10}$	4,8
HT186-G2	$7,2 \cdot 10^4$	$7,2 \cdot 10^{-5}$	512	$1,0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^{-9}$	36,7
HT200-3A-C1	$4,9 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	211	$4,8 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^{-9}$	4,3
HT220-M-D1	$2,9 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	200	$2,8 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^{-9}$	2,3
HT220-M-G8	$5,0 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	80	$2,3 \cdot 10^8$	$4,4 \cdot 10^{-9}$	1,5
Chip 2 - 14 RU MUC1-Peptid (15 AS Cys)						
HT186-B7	$9,0 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	62	$6,3 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^{-9}$	1,3
HT186-D11	$7,8 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	53	$1,5 \cdot 10^9$	$6,5 \cdot 10^{-10}$	0,6
HT186-G2	$7,3 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	82	$6,6 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^{-9}$	1,17

5.8 Epitop-Kartierung

Die Affinitätssteigerung von Antikörperfragmenten kann unter Umständen auf eine veränderte Aminosäuresequenz in der antigenen Determinante (Epitop) hindeuten. Es können „verschobene“ Epitope erkannt und gebunden werden oder das Epitop enthält zusätzliche Aminosäurereste und ist größer als das des Ursprungsklons. Um zu überprüfen, ob einer der genannten Effekte bei der Affinitätsreifung der hier generierten MUC1-Binder aufgetreten ist, wurde eine Epitop-Kartierung durchgeführt.

Auf Nitrocellulose-Membranen wurden 20 15mer Peptide, deren Sequenz aus der VNTR-Region von MUC1 stammt, mit einem Versatz von jeweils einer Aminosäure synthetisiert. Als Negativkontrolle diente ein MUC1-Peptid (15 AS, Spot 21) mit der invertierten Aminosäuresequenz des Spots 1. Anhand der Antikörperbindung und der folgenden Immunfärbung (Abb. 5.14) konnte mittels des Sequenzversatzes auf das erkannte Epitop rückgeschlossen werden (Tab. 5.7).

Bei allen scFv-Fragmenten wurden die identischen Spots (1-9, 18-20) angefärbt, folglich hat sich das erkannte und gebundene Epitop der affinitätsgereiften scFv-Fragmente nicht verändert. Somit entsprach das Epitop und damit die Antigen-Spezifität der Kandidaten dem Ursprungsklon IIB6 scFv.

**Abb. 5.14: Epitop-Kartierung**

Von allen affinitätsgereiften scFv-Kandidaten und dem Ursprungsklon IIB6 scFv wurden jeweils $\approx 30 \mu\text{g}$ scFv auf den Peptidmembranen inkubiert. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte per Immunfärbung über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fc spez.) AP-Konjugat, Substrat: MTT/BCIP. NWS = Nachweissystem zur Hintergrundkontrolle, ob die für die Immunfärbung benötigten Antikörper mit den Peptid-Membranen interagieren.

Tab. 5.7: Sequenzübersicht: Epitop-Kartierung

Aminosäuresequenzen der einzelnen Spots auf den Nitrocellulose-Membranen. Spots, die eine Immunfärbung aufwiesen, sind grau hinterlegt. Die Sequenz des erkannten Epitops ist fett markiert. VNTR = Sequenz der VNTR-Region von MUC1, der repetitive Bereich ist unterstrichen dargestellt.

Spot	Aminosäuresequenz																			
VNTR	S	T	A	P	P	A	H	G	V	<u>T</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>D</u>	T	R	P	A	P	G
14	S	T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	T					
15		T	A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	T	R				
16			A	P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	T	R	P			
17				P	P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	T	R	P	A		
18					P	A	H	G	V	T	S	A	P	D	T	R	P	A	P	
19						A	H	G	V	T	S	A	P	D	T	R	P	A	P	G
20							H	G	V	T	S	A	P	D	T	R	P	A	P	G
01								G	V	T	S	A	P	D	T	R	P	A	P	G
02									V	T	S	A	P	D	T	R	P	A	P	G
03										T	S	A	P	D	T	R	P	A	P	G
04											S	A	P	D	T	R	P	A	P	G
05												A	P	D	T	R	P	A	P	G
06													P	D	T	R	P	A	P	G
07														D	T	R	P	A	P	G
08															T	R	P	A	P	G
09																R	P	A	P	G
10																	P	A	P	G
11																		A	P	G
12																			P	G
13																				G

5.9 Analyse des Aggregationsverhaltens mittels Größenausschlusschromatographie

ScFv-Fragmente können je nach ihrer Struktur und Aminosäuresequenz zur spontanen Ausbildung von Dimeren und/oder Aggregaten neigen. Durch ein „Aufklappen“ der scFv-Struktur lösen sich V_H und V_L voneinander, bleiben aber durch den Peptid-Linker miteinander verbunden. Zwei derart „aufgeklappte“ scFv können sich zu einem Dimer zusammenlagern, das auch als *Diabody* bezeichnet wird.

Dimere und Aggregate können mehr als eine Bindestelle besitzen und durch den Aviditätseffekt ein stärkeres apparentes Bindungsverhalten aufweisen. Der Aviditätseffekt kann die apparente Affinität signifikant verstärken, wobei eine exakte Voraussage des Aviditätseffekts schwierig ist (vgl. Abschnitt 2.3). Dies kann bei der Charakterisierung der Antikörperfragmente dazu führen, dass vermeintlich monovalente scFv-Fragmente auf Grund einer starken Tendenz zur Dimerbildung verbesserte Bindungseigenschaften aufweisen, die letztlich jedoch nur auf Aviditätseffekten beruhen.

Um die Tendenz der α -MUC1-scFv-Fragmente zur Ausbildung von *Diabodies* oder Aggregatstrukturen zu überprüfen, wurden diese mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht. Dieses Verfahren erlaubt die Auftrennung von Proteinen nach Größe sowie Konformation.

Anhand einer Kalibrierkurve (erstellt mit Proteinen bekannter Größe) konnten die erhaltenen Peaks den korrespondierenden Formen zugeordnet werden. Der Peak bei $\approx 16,5$ mL entsprach einem scFv-Monomer (Abb. 5.15). Peaks bei $\approx 14,5$ mL repräsentierten *Diabodies* und Messsignale im Bereich < 14 mL deuteten auf größere scFv-Aggregate hin. Bei ≈ 20 mL zeigten sich sonstige Verunreinigungen (Größe < 10 kDa) der Proben.

Für alle affinitätsgereiften Kandidaten außer HT220-M-G8 war im Vergleich mit IIB6 scFv eine reduzierte Neigung zur Dimerbildung zu verzeichnen.

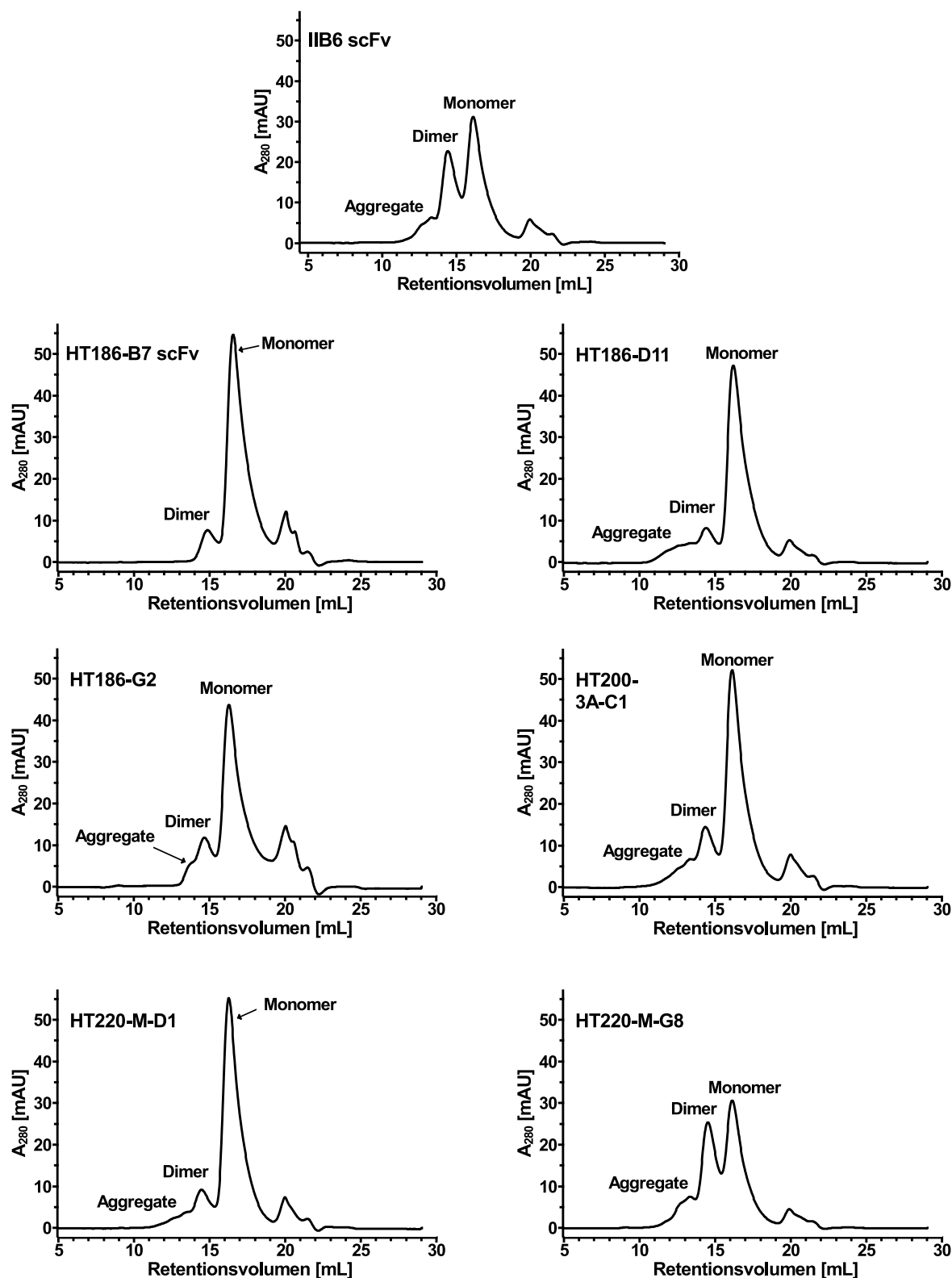


Abb. 5.15: Größenausschlusschromatographie

80 µg jedes aufgereinigten scFv-Fragments wurden auf eine Superdex200 10/300 Säule (GE Healthcare) geladen und mit einer Fließgeschwindigkeit von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (PBS) aufgetrennt. Dargestellt sind die Absorptionssignale bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ je Retentionsvolumen.

5.10 Stabilitätsanalyse

Um die Stabilität der produzierten und aufgereinigten α -MUC1-scFv zu untersuchen, erfolgte ein ELISA-Stabilitätstest. Hierzu wurde von jedem Kandidaten eine Stammlösung mit einer Konzentration von $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ hergestellt. Aliquots dieser Stammlösung wurden bei -80°C gelagert. In bestimmten Zeitabständen wurde pro Klon ein Aliquot entnommen und bei 37°C inkubiert. Die Stabilität über einen Zeitraum von maximal 30 Tagen untersucht. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der scFv-Fragmente in PBS hergestellt und ein Antigen-ELISA auf MUC1-Peptid durchgeführt. Das ELISA-Signal eines frisch aufgetauten Aliquots (0 Tage) diente als Referenzpunkt für die Auswertung. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.16 für $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ scFv sowohl absolut als auch relativ dargestellt. Die Resultate aller Verdünnungsstufen jedes Klon sind im Anhang angeführt.

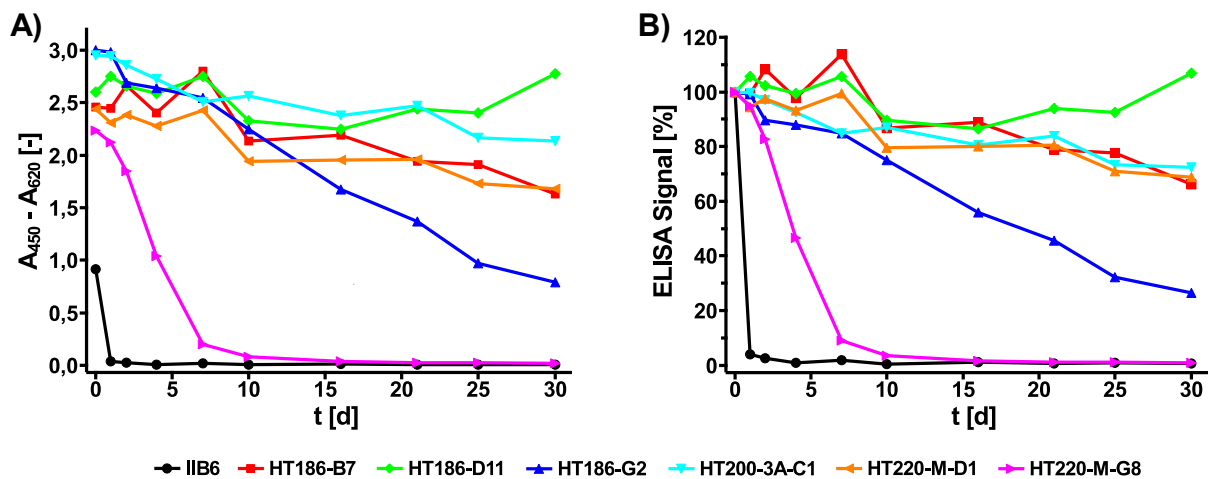


Abb. 5.16: ELISA: scFv-Stabilitätstest

A) Darstellung der absoluten Werte aller getesteten scFv-Fragmente ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) des Antigen-ELISA. **B)** Darstellung der relativen Werte; der Wert für die Referenzprobe (0 Tage) wurde als 100 % festgesetzt. Jede Kavität wurde mit 50 ng MUC1-Peptid (32 AS Cys) beschichtet. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB.

Für den Ausgangsklon IIB6 scFv konnte nur für die Referenzprobe (0 Tage) ein ELISA-Signal gemessen werden. Eine signifikante Reduktion der ELISA-Signale zeigte sich zudem für die Klone HT220-M-G8 und HT186-G2. Ein Verlust der Antigenbindung von $\approx 30\%$ konnte für HT186-B7, HT200-3A-C1 und HT220-M-D1 nach 30 Tagen verzeichnet werden. Die geringste Signalreduktion wies HT186-D11 auf.

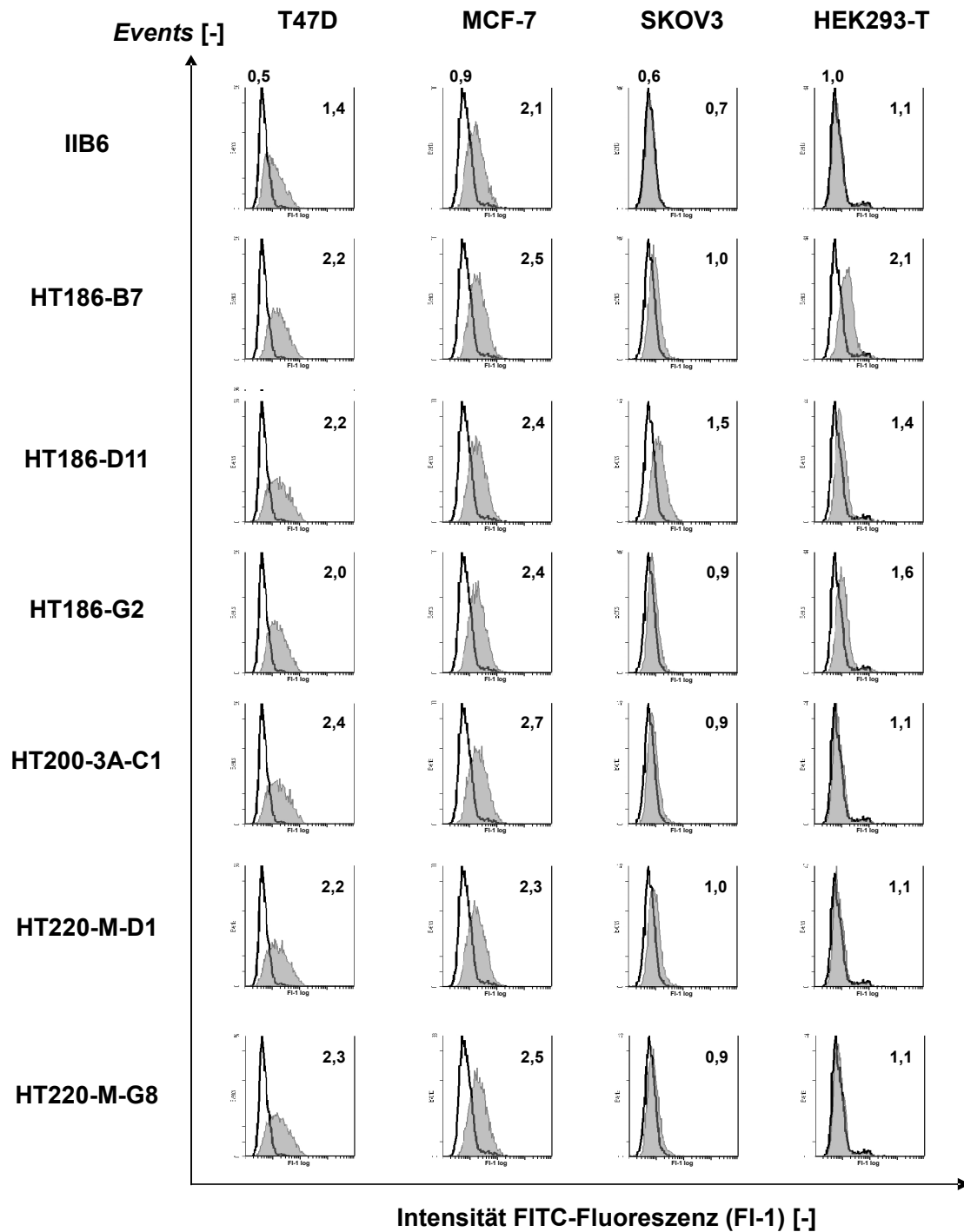
5.11 Analyse der Bindungseigenschaften an Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie

Die komplette Selektion und bisherige Charakterisierung der affinitätsgereiften Antikörperfragmente erfolgte auf MUC1-Peptiden, welche die repetitive Aminosäuresequenz der VNTR-Region von MUC1 enthielten. Für eine potentielle weitere Anwendung der Klone im Bereich Diagnostik und Therapie musste die Bindung an tumorzellassoziertes MUC1 überprüft werden. Sollte ein affinitätsgereifter Kandidat ausschließlich Bindung an MUC1-Peptid, jedoch nicht mehr an tumorzellassoziertes MUC1 zeigen, wäre die weitere Charakterisierung dieses Klon nicht sinnvoll. Zur Überprüfung der Bindungseigenschaften der scFv-Fragmente wurden vier verschiedene Zelllinien getestet, die beiden MUC1-positiven Mammakarzinom-Zelllinien T47D und MCF-7, die MUC1-positive Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3 und als Kontrolle die MUC1-negative Zelllinie HEK293-T.

Die vier Zelllinien wurden in Polystyrol-Gewebekulturschalen kultiviert. Nach Ernte der Zellen wurden pro Messansatz jeweils 200.000 Zellen für die Immunmarkierung eingesetzt. Die Messungen erfolgten in einem Cytomics-FC500 Durchflusszytometer (Beckman-Coulter). Zur Einstellung der Messfenster und für die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde pro Zelllinie je ein Ansatz ohne Antikörper inkubiert und mit Propidium-Iodid angefärbt. Für die eigentlichen Messungen wurden nur Ereignisse für lebende Zellen herangezogen (*Gate* im FSC/SSC-Plot). Pro Messung wurde jeweils 1 µg aufgereinigtes scFv-Fragment eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über Maus- α -His₆-IgG und Ziege- α -Maus-IgG (Fc spez.) FITC-Konjugat.

Für T47D Zellen konnte eine Bindung der scFv-Fragmente an die Zellen durch eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich mit der Negativkontrolle (nur Sekundärantikörper) (Abb. 5.17) für alle scFv-Fragmente nachgewiesen werden. Verglichen mit IIB6 war bei den sieben untersuchten affinitätsgereiften scFv-Fragmenten eine verstärkte Bindung erkennbar. Auf MCF-7 Zellen konnte für alle Klone ein ähnliches Messsignal verzeichnet werden. Verglichen mit der Negativkontrolle konnte ausschließlich der Klon HT186-D11 eine signifikante Bindung auf SKOV3 Zellen hervorrufen. Im Gegensatz dazu wurde für die Klone HT186-B7 und HT220-M-D1 nur eine geringfügige Bindung an SKOV3 Zellen nachgewiesen, während bei den anderen Kandidaten nahezu keine Veränderungen des Messsignals verglichen mit den Negativkontrollen auftraten. Der Ursprungsklon IIB6 scFv zeigte keine Bindung an SKOV3 Zellen. Für alle getesteten Varianten konnte eine Bindung an T47D und MCF-7 Zellen nachgewiesen werden. Auf SKOV3 Zellen zeigte dagegen nur HT186-D11 eine signifikante Bindung. Eine unspezifische Bindung an HEK193-T Zellen wurde für HT186-B7 beobachtet, in geringem Maße auch für HT186-G2 und minimal für HT186-D11.

Alle affinitätsgereiften scFv-Fragmente banden an MUC1-positive Tumorzellen. Die Erkennung von SKOV3 Zellen war nur mit einigen affinitätsgereiften Klonen möglich. Potentielle unspezifische Wechselwirkungen einiger Kandidaten auf MUC1-negativen Zellen sollten mit anderen Zelllinien weiter untersucht werden.

**Abb. 5.17: Durchflusszytometrie**

Analyse von jeweils 1 µg scFv aller Kandidaten auf vier verschiedenen Zelllinien. Dargestellt ist die Veränderung der Fluoreszenzintensität nach Inkubation und Nachweis des jeweiligen scFv-Fragments (grauer Peak) verglichen mit der Negativkontrolle (nur Nachweis-Antikörper; weißer Peak). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) ist für das Nachweissystem (nur obere Reihe) und die Proben für die jeweilige Messung angegeben. Pro Messung wurden 5000 lebende Zellen ausgewertet. Der Nachweis der gebundenen scFvs erfolgte über Maus- α -His₆-IgG und Ziege- α -Maus-IgG (Fc spez.) FITC-Konjugat.

5.12 Bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenzen

5.12.1 *Alignment* der Aminosäuresequenzen

Die bereits erhaltenen DNA-Sequenzen wurden nicht nur zur Aussortierung von identischen Klonen herangezogen. Anhand der DNA-Sequenzen konnten mit Hilfe der VBASE2-Datenbank die Aminosäuresequenz der Klone und die Zuordnung von *Framework*- (FR-) und CDR-Regionen ermittelt werden. VBASE2 bedient sich dabei den Zuordnungsregeln der IMGT-Datenbank. Ein Sequenz-*Alignment* erlaubte die Lokalisation von Aminosäureaustauschen aufgrund von Mutationen in den scFv-Genen der affinitätsgereiften Kandidaten. Die Aminosäuresequenzen der sechs Kandidaten der Charakterisierung und des Ausgangsklons IIB6 scFv sind in Tab. 5.8 dargestellt. Im Bereich der CDR2-Region in V_L zeigte sich ein Mutations-*Hotspot* mit häufigen Aminosäureaustauschen. Da jedes der sechs affinitätsgereiften scFv-Fragmente in diesem Bereich Veränderungen aufwies, ist es möglich, dass der CDR2-Bereich von V_L die Affinität der Antikörperfragmente signifikant beeinflusst.

Tab. 5.8: Vergleich der Aminosäuresequenzen
Darstellung der Aminosäuresequenzen von IIB6 scFv und sechs affinitätsgereiften Kandidaten. Die Sequenzbereiche für V_H und V_L sind separat angeführt. Die Sequenzen wurden mittels VBASE2 in FR- und CDR-Bereiche eingeteilt. Weiterhin sind die in den Antikörperfragmenten zusätzlich enthaltenen Sequenzbereiche angeführt. Aminosäuren, die identisch mit dem Ursprungsklon IIB6 scFv sind, sind mit einem Punkt gekennzeichnet. Aminosäureaustausche sind direkt durch die korrespondierende Aminosäure an der jeweiligen Position markiert. * repräsentiert eine „stille“ Mutation in der DNA-Sequenz. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind unterstrichen.

Aminosäuresequenz							
V _H	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IIB6	QMQLVSGAEVKKPKGASVAVKSCCKAS	GYTFTHY	MEHWVQAPQGGLEMMGM	IDPVYGGT	KYAQNFGWVTMTDTSIRTAVMELSRRLSDDPTAMYYC	AREVTGDRGQFDK	WGQGTIVTVAS
HT186-B7*
HT186-D11E..L.....S.....L.....
HT186-G2	R.....*..L.....A.....R.....*
HT200-3A-C1****
HT220-M-D1L.....A.....**P.....**
HT220-M-G8M.....S.....H.....*..S.....S.....*

Aminosäuresequenz							
V _L	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IIB6	QSVLTQPPSVSVAPRGKTARTTCGGN	NIGSKS	VHWYQDKPQAPVLYIY	YDS	DRPSGIPERFSGNSGNTATITISRVEAGDEADYYC	QYWDSSSDMV	FGGGTKLTVL
HT186-B7**A.....G.....Y.....
HT186-D11*A.....G.....	N..*.....
HT186-G2**G.....S.....
HT200-3A-C1**N.....K.....*
HT220-M-D1*..V.....I.....NN.....M.....*I.....
HT220-M-G8*G.....T..M.....S.....*..R..I.....

Aminosäuresequenz					
V _H	N' IgG1 C _{H1}	YoI-Linker	V _L	N' IgG1 C _L	
IIB6	S.O.	ASTRGPSVKL	EEGEFSEARV	S.O.	GQPKAAPSVTLFPPS
HT186-B7	S.O.	S.O.*
HT186-D11	S.O.	S.....*	S.O.S*
HT186-G2	S.O.K..L..H.....	S.O.*
HT200-3A-C1	S.O.*A.....	S.O.
HT220-M-D1	S.O.	S.O.S.....*
HT220-M-G8	S.O.	S.O.

5.12.2 Bestimmung der *Humanness* und der Keimbahn-Homologie

Die so genannte *Humanness* (Abhinandan & Martin, 2007) bezeichnet die Sequenzhomologie zwischen einer gegebenen Aminosäuresequenz der variablen Domäne eines Antikörpers mit einem Set aus bekannten humanen Sequenzen der Kabat-Datenbank. Die *Humanness* wird mittels des *Z-score* quantifiziert. Dieser Wert errechnet sich aus der Standardabweichung der mittleren Sequenzhomologie des gesamten humanen Repertoires der Datenbank. Der *Z-score* ist dabei das Vielfache der Standardabweichung des Datenbank-Repertoire-Homologie-Mittelwerts, um den die untersuchte Sequenz abweicht (Abb. 5.18). Der *Z-score* kann einen Hinweis auf mögliche Immunogenität des Antikörpers geben. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der *Z-score* kein absolutes Maß darstellt; es wurde lediglich eine Korrelation zwischen extremen *Z-scores* (am unteren Ende der jeweiligen Skala, gleichbedeutend mit einer eher untypischen humanen Sequenz) und möglicher Immunogenität des Antikörpers berichtet (Abhinandan & Martin, 2007). Ferner ist per Definition jeder Antikörper aus einer humanen Antikörpergenbibliothek als humaner Antikörper anzusehen. Es wurde überprüft, ob die in den affinitätsgereiften scFv-Fragmenten gefundenen Sequenzveränderungen zu anderen *Z-scores* im Vergleich zum IIB6 scFv führen. Für die Sequenzen der schweren Ketten zeigten sich nur relativ geringe Abweichungen (bis max. 20 %), bei den leichten Ketten wurde für HT220-M-D1 die stärkste Abweichung beobachtet (vgl. Tab. 5.9). Generell lag keiner der ermittelten *Z-scores* am unteren Ende der Skala.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der V-Regionen mit *in silico* translatierten Sequenzen der nächstverwandten Antikörper-Keimbahngene (gemäß VBASE2, vgl. Tab. 5.10) kann ebenfalls zur Abschätzung der Immunogenität herangezogen werden (siehe. Tab. 5.9). Hierbei liegt die Annahme zu Grunde, dass Keimbahn-Sequenzen nicht immunogen sind. Die ermittelten Homologien wiesen für V_H stärkere Abweichungen auf als für V_L . Im Vergleich der Homologien der Antikörperfragmente untereinander waren lediglich geringe Abweichungen nachweisbar.

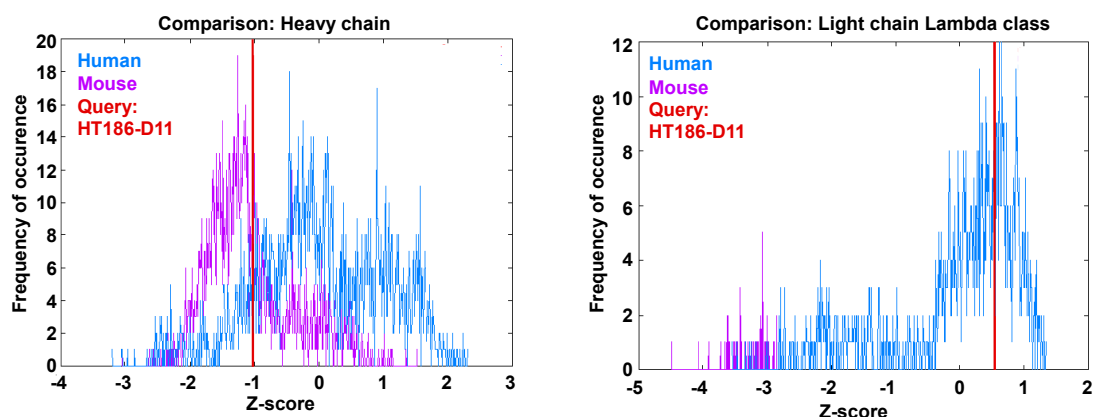


Abb. 5.18: Beispielhafte *Humanness*-Analyse von HT186-D11

Sowohl für die Aminosäuresequenz der schweren als auch der leichten Kette von HT186-D11 wurde per Datenbankabfrage (<http://www.bioinf.org.uk/abs/shab/>) der *Z-score* ermittelt. Bereiche mit einer hohen humanen Sequenzidentität sind blau dargestellt, Bereiche mit muriner Sequenzhomologie violett. Die Einordnung des untersuchten Antikörpers ist mit einem roten Balken gekennzeichnet.

Tab. 5.9: Humanness-Analyse und Sequenzhomologie zu Keimbahn-Gensegmenten

Auflistung der *Z-scores* und der Keimbahngen-Sequenzhomologie. Die angeführten relativen Werte der Homologie beziehen sich auf die Aminosäuresequenzen der *in silico* translatierten Keimbahngene (vgl. Tab. 5.10).

Antikörper	schwere Kette		leichte Kette	
	Keimbahn-Homologie [%]	Z-score	Keimbahn-Homologie [%]	Z-score
IIB6	85,8	-0,97	98,1	0,63
HT186-B7	85,8	-0,96	93,5	0,20
HT186-D11	82,5	-1,00	95,3	0,55
HT186-G2	82,5	-1,10	96,3	0,43
HT200-3A-C1	85,8	-0,97	93,5	0,44
HT220-M-D1	83,3	-1,18	90,1	-0,02
HT220-M-G8	82,5	-1,11	95,3	0,31

Tab. 5.10: Keimbahn-Genfamilien

Die aufgelisteten Keimbahn-Gensegmente besitzen die größte Homologie zu den α -MUC1-Antikörperfragmenten gemäß VBASE2.

Keimbahngene				
V-Gen		D-Gen	J-Gen	
V _H	humIGHV165	X13972 IGHD3-10*01	X86355 IGHJ4*02	
V _L	humIGLV169	–	D87023 IGLJ3*02	

5.12.3 Auffinden von ungepaarten Cysteinresten und möglichen *N*-Glykosylierungsstellen

Da es durch die Zufallsmutagenese zu beliebigen Aminosäureaustauschen kommen kann, wurde untersucht, ob die Aminosäuresequenzen der affinitätsgereiften α -MUC1 Antikörperfragmente ungepaarte Cysteinreste enthalten. Diese könnten zu unerwünschten Effekten wie Aggregation, fehlerhafter Faltung oder kovalenter Bindung der scFv-Fragmente an andere Proteine führen. Neben den jeweils an Position 23 und 104 (gemäß IMGT Annotation) befindlichen Cysteinresten, die für die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken und die ordnungsgemäße Faltung der Antikörperfragmente essentiell sind, wurden keine weiteren Cysteinreste in den Aminosäuresequenzen der affinitätsgereiften scFv-Fragmente nachgewiesen.

Durch die Zufallsmutagenese können außerdem potentielle *N*-Glykosylierungsstellen in den scFv-Fragmenten entstehen. Mit Hilfe des bioinformatischen Werkzeugs NetNGlyc 1.0 Server können potentielle *N*-Glykosylierungsstellen (N-x-S/T) in den Aminosäuresequenzen aufgefunden werden. Für die Klone HT200-3A-C1 und HT220-M-D1 wurde im CDR2 von V_L jeweils eine mögliche *N*-Glykosylierungsstelle gefunden. Die Mutation Y → N (Position 56 gemäß IMGT Annotation) führt zur Entstehung des Erkennungsmotivs N-x-S. In den Aminosäuresequenzen der übrigen Klone wurden keine potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen nachgewiesen.

5.13 Multimerisierung von scFv-Fragmenten

Das Ziel der bislang angeführten Versuche war die Verbesserung der Affinität der scFv-Antikörper zu ihrem Antigen. Die Affinität ist dabei ein Maß für die Bindungsstärke einer Bindung zwischen zwei Interaktionspartnern. Besitzt ein Molekül mehr als eine Bindungsstelle, kann es zu Aviditätseffekten kommen. Dabei erhöht sich die effektive Bindung zwischen den Bindungspartnern deutlich (apparente Affinität). Mittels Multimerisierung von scFv-Fragmenten kann der Aviditätseffekt zur Verbesserung der effektiven Bindungseigenschaften genutzt werden.

Durch die Fusion von scFv-Genen mit Genen von Multimerisierungsdomänen können multivalente scFv-Komplexe hergestellt werden, die mittels Aviditätseffekt eine verbesserte Bindung an das jeweilige Antigen zeigen. Eine schematische Darstellung der verwendeten Multimerisierungsstrategien ist in Abb. 5.19 angeführt.

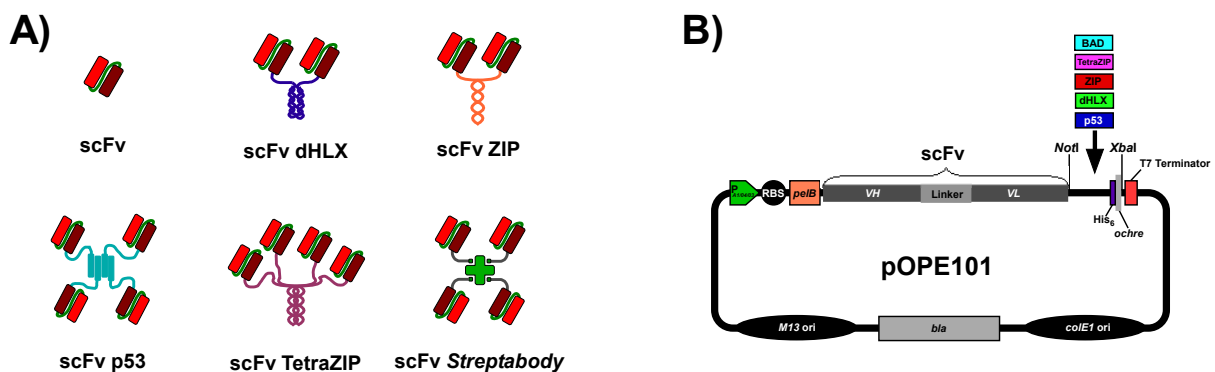


Abb. 5.19: Schematische Darstellung der scFv-Multimere und der Klonierungsstrategie

A) Verschiedene Varianten zur Multimerisierung von scFv-Fragmenten. **B)** Klonierungsstrategie zur Herstellung von scFv-Fragmenten mit Multimerisierungsdomänen. Die Gene für die korrespondierenden Multimerisierungsdomänen wurden mit Hilfe überlappender Oligonukleotide (Primer) erzeugt und in den Vektor pOPE101 hinter die jeweiligen scFv-Gene kloniert.

Die Varianten dHLX, ZIP, p53 und TetraZIP sind selbstassoziiierende Domänen und führten direkt nach der Expression zu multimerisierten scFv-Fragmenten. Die Herstellung von *Streptabodies* erfolgte über die Zwischenstufe in Form von *in vivo* biotinylierten scFv-Fragmenten. Durch Koexpression der *E. coli* Biotin Ligase wird Biotin kovalent an eine C-terminal mit dem Antikörperfragment fusionierte Biotin-Akzeptordomäne (BAD, Avi-Tag-Sequenz gemäß Avidity LLC) gebunden. Die biotinylierten scFv-Fragmente wurden mit Streptavidin im passenden stöchiometrischen Verhältnis inkubiert und bildeten danach tetravalente *Streptabodies* aus. Diese Methode erlaubte eine Multimerisierung *on demand*.

Es wurden drei verschiedene scFv-Fragmente in Fusion (D1.3, IIB6 und HT186-D11) mit allen fünf Multimerisierungsdomänen in *E. coli* TG1 periplasmatisch exprimiert und anschließend mittels IMAC aufgereinigt. Die Multimerisierungsdomänen hatten einen signifikanten Einfluss auf die Produktionsausbeuten (μg Zielprotein pro L Kultur). So konnten z. B. die Konstrukte mit TetraZIP-Domäne nicht in ausreichendem Maße produziert und nicht weiter untersucht

werden (vgl. Tab. 5.11). Bei den *in vivo* biotinylierten scFv-Fragmenten wurde jeweils der Biotinylierungsgrad bestimmt. Dieser lag in allen Fällen bei >60 % (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die biotinylierten scFv-Fragmente in einem molaren Verhältnis von 7:1 mit *core*-Streptavidin inkubiert und die *Streptabodies* per Größenausschlusschromatographie abgetrennt (Daten nicht gezeigt).

Tab. 5.11: Produktionsausbeuten multimerisierter scFv-Fragmente

Tabellarische Darstellung der Produktionsausbeuten aller untersuchten Varianten. Zur Verdeutlichung des Einflusses der Multimerisierungsdomänen auf die Effizienz der Produktion und der Aufreinigung sind ebenfalls die normierten Werte (relativ zur maximalen Ausbeute d. h. scFv-Fragmente ohne Multimerisierungsdomäne) in Prozent angegeben.

Antikörper	Produktionsausbeute [$\mu\text{g L}^{-1}$]					
	keine Domäne	p53	dHLX	ZIP	TetraZIP	BAD
D1.3 scFv	290	3	84	102	-	112
	100 %	1,0 %	29,0 %	35,2 %	-	38,6 %
IIB6 scFv	458	1	145	120	-	104
	100 %	0,2 %	31,7 %	26,2 %	-	22,7 %
HT186-D11 scFv	1295	10	61	38	-	834
	100 %	0,8 %	4,7 %	2,9 %	-	64,4 %

Verdünnungsreihen der aufgereinigten scFv-Varianten wurden im Antigen-ELISA analysiert (Abb. 5.20). Der Vergleich der Signalverläufe zeigte bei allen drei untersuchten Antikörpern einen rascheren Anstieg des ELISA-Signals bei tetravalenten Varianten. Auch für die ZIP- bzw. dHLX-vermittelten dimeren scFv-Fragmente konnte eine verbesserte Bindung an das Antigen gemessen werden, einzig bei HT186-D11 zeigte die dHLX-Variante keine Veränderung des Signalverlaufs im Vergleich mit der Variante ohne Multimerisierungsdomäne. Die monovalenten Fragmente mit BAD-Domäne zeigten in allen drei Versuchen einen Anstieg des ELISA-Signals erst bei der Verwendung von hohen Proteinkonzentrationen. Für die scFv-Fragmente ohne Multimerisierungsdomäne wurde für IIB6 und HT186-D11 die Monomerfraktion nach SEC-Auftrennung verwendet, D1.3 scFv zeigte keine Tendenz zur Ausbildung von Dimeren (Daten nicht gezeigt). Die Multimerisierung von scFv-Fragmenten konnte durch Ausnutzung des Aviditätseffekts die Bindung an das Antigen maximal um den Faktor 5 für D1.3 und HT186-D11 und um den Faktor 25 für IIB6 verbessern.

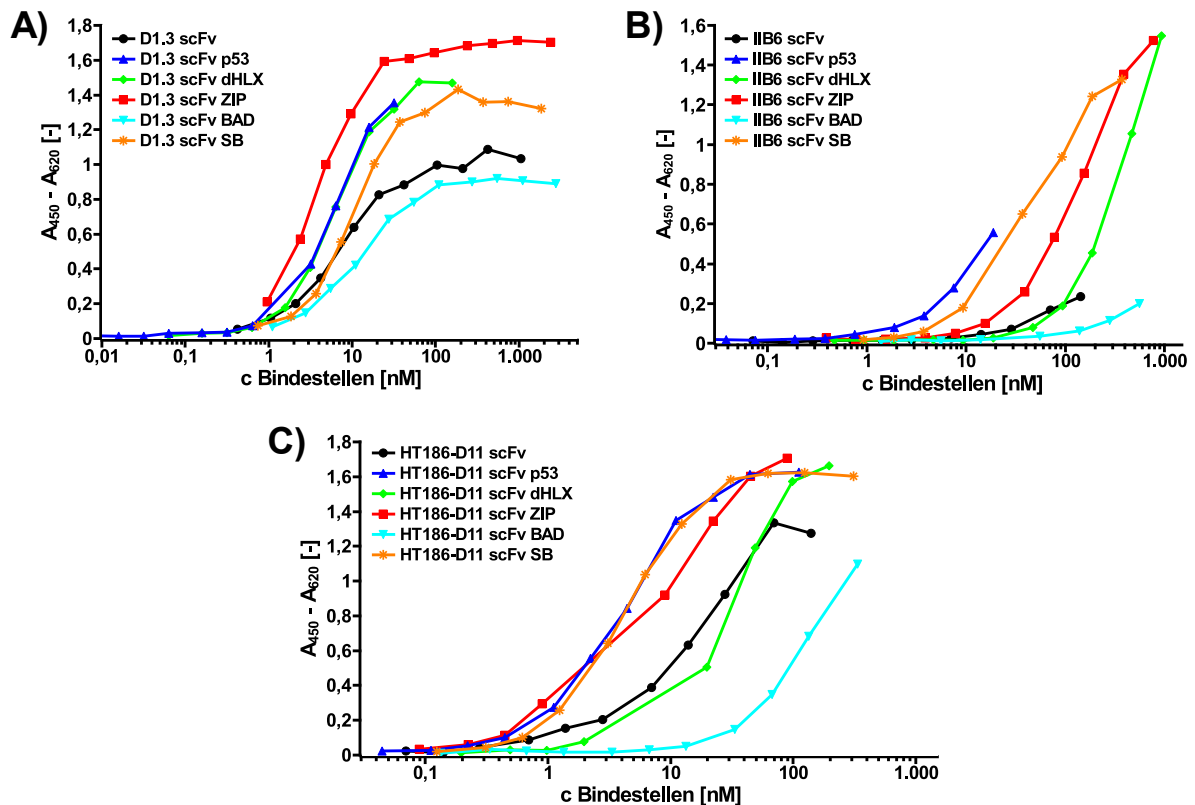


Abb. 5.20: ELISA mit verdünnten multimeren scFv-Fragmenten

A) Ergebnisse für alle Varianten von D1.3 scFv **B)** IIB6 scFv **C)** HT186-D11 scFv. SB = *Streptabody*. Verschiedene Konzentrationen der multimerisierten scFv-Fragmente wurden im Antigen-ELISA auf Bindung an das korrespondierende Antigen untersucht. Es sind die Konzentrationen der Bindestellen angegeben. Jede Vertiefung wurde mit 1 μ g Antigen (MUC1-Peptid (32 AS Cys) für IIB6, HT186-D11 oder Lysozym für D1.3) beschichtet. Die dargestellten Messergebnisse sind Mittelwerte von Duplikat-Messwerten. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte über Maus- α -His₆-IgG und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB. Die Werte der Negativkontrollen (BSA) wurden bereits direkt von den Messwerten abgezogen und es wurde daher kein Graph für BSA angegeben. (Diese Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Stefanie Mertens unter meiner Anleitung erzielt.)

Weiterhin wurden alle fünf Multimerisierungsdomänen auf ihre Kompatibilität mit dem Phagen-Display untersucht. Hierzu wurden D1.3 scFv Antikörperphagen unter Verwendung aller Multimerisierungsdomänen hergestellt und im Phagen-ELISA auf Bindung an Lysozym getestet. Zur weiteren Validierung der Phagen-Display Kompatibilität der Domänen wurden zudem andere Antikörperformate untersucht. D1.3 Fab und D1.3 scFab Δ Cys wurden ebenfalls mit den Multimerisierungsdomänen fusioniert und auf M13K07 Phagen präsentiert. Die erzielten Antikörperphagentiter lagen bei allen Varianten (scFv, Fab, scFab Δ Cys) in einem Bereich zwischen $2,2$ und $8,6 \cdot 10^{12}$ cfu mL⁻¹. Erneut wurde die Bindung der Antikörperphagen an Lysozym mittels ELISA getestet. Die Resultate sind in Abb. 5.21 dargestellt. Generell konnten mit allen untersuchten Varianten funktionelle Antikörperphagen hergestellt werden. Für die Varianten ohne Multimerisierungsdomäne, mit dHLX- und BAD-Domäne wurde jeweils eine bessere Bindung an das Antigen nachgewiesen verglichen mit den übrigen Varianten.

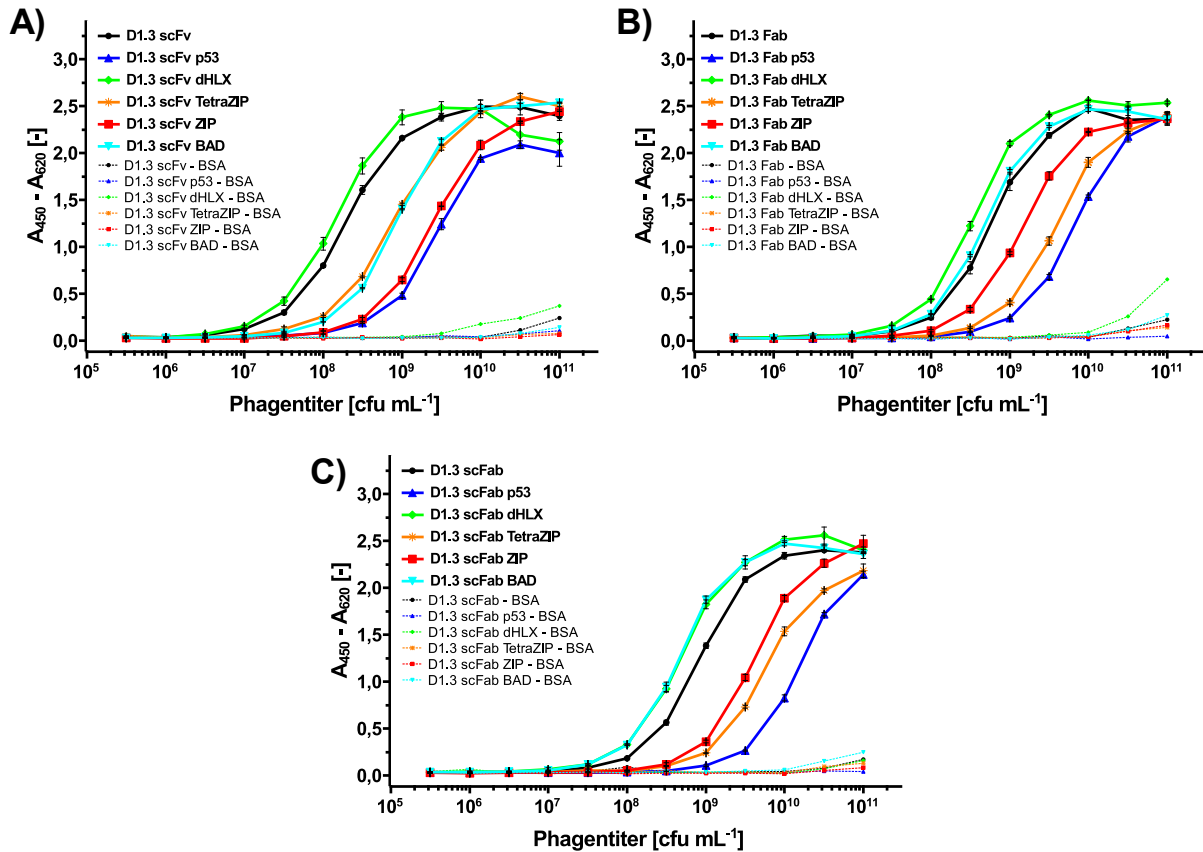


Abb. 5.21: ELISA mit verschiedenen D1.3 Antikörperphagen

A) Ergebnisse für alle Varianten von D1.3 scFv **B)** D1.3 Fab **C)** D1.3 scFab Δ Cys. Verschiedene Antikörperphagenkonzentrationen wurden im Antigen-ELISA auf Bindung an Lysozym untersucht. Jede Vertiefung wurde mit 1 μ g Antigen (MUC1-Peptid (32 AS Cys) (IIB6, HT186-D11) oder Lysozym (D1.3)) beschichtet. Der Nachweis der gebundenen Antikörperphagen erfolgte über Maus- α -M13-IgG (pVIII spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB.

6 Diskussion

Antikörper sind gegenwärtig die wichtigsten rekombinanten Proteine zur Behandlung und Diagnostik von Tumorerkrankungen. Für die therapeutische Anwendung ist die Verfügbarkeit hochaffiner Antikörper von besonderer Bedeutung. Mucin 1 (MUC1) ist als *target* für die Tumorthherapie interessant, da es auf vielen epithelialen Tumoren überexprimiert wird und dort häufig aberrante, weniger komplexe Glykosylierungen aufweist. Bislang wurden keine hochaffinen humanen Antikörper MUC1 beschrieben, die in der Therapie Einsatz finden. Derzeit werden lediglich murine und humanisierte Varianten muriner α -MUC1-Antikörper in klinischen Studien untersucht. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit hochaffine humane α -MUC1-Binder auf Basis des von Toleikis (2004) isolierten Antikörperfragments IIB6 scFv generiert.

6.1 Affinitätsreifung von α -MUC1-Antikörperfragmenten

Die Verbesserung der Affinität von Antikörpern findet im Körper durch ein Zusammenspiel von somatischer Mutation in den Antikörpergenen und der klonalen Selektion von B-Lymphozyten mit höheraffinen Antikörpern statt. Dieser als Affinitätsreifung bezeichnete Prozess kann in *in vitro* nachgebildet werden. Die zufällige Mutation von Antikörpergenesequenzen kann mit Hilfe sequenzieller *Error-prone*-PCRs durchgeführt werden und ermöglicht hohe Mutationsraten von bis zu 50 Punktmutationen pro 1000 bp (5 %) (Graff *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um zufällige Punktmutationen in das Gen von IIB6 scFv einzufügen und anschließend Antikörpergenbibliotheken basierend auf diesen Mutanten zu erzeugen. Mittels Phagen-Display wurden aus diesen Bibliotheken hochaffine scFv-Fragmente gegen MUC1 selektiert. Für die Erzeugung von zufälligen Mutationen wurden ebenfalls *E. coli* Mutatorstämme und die *Error-prone rolling-circle* DNA-Amplifikation eingesetzt. Beide Methoden ermöglichten nur geringe Mutationsraten und wiesen Schwierigkeiten in der Handhabung auf. Aus diesem Grund wurden die Strategien nicht weiter verfolgt.

Durch vier bzw. sieben aufeinanderfolgende *Error-prone*-PCRs mit je 35 Zyklen konnte eine durchschnittliche Mutationsrate von ≈ 20 bzw. ≈ 30 Punktmutationen pro scFv-Gen (≈ 850 bp) erzielt werden. Diese Mutationsraten lagen in einer Größenordnung, für die bereits Affinitätsreifungen von Antikörperfragmenten erfolgreich durchgeführt und beschrieben wurden (Daugherty *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde vom Hersteller für die Mutazyme II DNA-Polymerase eine deutlich höhere Mutationsrate von bis zu 16 Punktmutationen pro 1000 bp und PCR angeführt, d. h. mehr als dreimal so hoch wie die in dieser Arbeit erreichte Rate. Da durch sequenzielle PCRs die erwünschte Mutationsrate trotzdem erzielt werden konnte, wurde auf eine weitere Optimierung der *Error-prone*-PCR verzichtet.

Die hohe Zahl von bis zu 7 x 35 *Error-prone*-PCR-Zyklen wirkte sich negativ auf die Qualität

der amplifizierten DNA aus. Insbesondere die Enden der DNA-Fragmente können ungewollte Veränderungen aufweisen, die eine anschließende Klonierung erschweren. Bei der Herstellung der beiden Antikörpergenbibliotheken wurde beobachtet, dass die Qualität der Bibliotheken mit 45 % bzw. 25 % vollständigen Antikörperfragmentgenen gering war. Zum Vergleich, die humanen naiven Antikörpergenbibliotheken HAL4 und HAL7 (Hust *et al.*, 2007a) enthielten 87 % bzw. 89 % vollständige Antikörperfragmentgene (Michael Hust, persönliche Mitteilung). Eine nachträgliche DNA-Amplifikation mit einer *high-fidelity* DNA-Polymerase vor der Bibliotheksklonierung konnte die Qualität nicht verbessern (Daten nicht gezeigt). Es wurden hohe Transformations-effizienzen ($>10^7$ cfu) erreicht, die die relativ geringe Qualität der Antikörpergenbibliotheken kompensierten. Unter Berücksichtigung des Anteils der Klone mit vollständigen Antikörperfragmentgenen lagen die theoretischen Komplexitäten im Bereich von 10^7 unabhängigen Klonen und damit mindestens um den Faktor zwei höher als bei anderen Bibliotheken, die für die Affinitätsreifung von Antikörperfragmenten bisher beschrieben wurden (Schier *et al.*, 1996; Daugherty *et al.*, 2000; Graff *et al.*, 2004; Pavoni *et al.*, 2006). Außerdem war durch die Mutagenese eines Antikörperfragmentgens als Basis für die Bibliotheken die Spezifität zum Antigen MUC1 bereits vorgegeben und dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass sich hochaffine Binder anreichern lassen, erhöht.

Für die Selektion von affinitätsgereiften Antikörperfragmenten wurden drei verschiedene Panning-Strategien angewendet. Beim *Off-rate*-Panning erfolgte die Isolation hochaffiner Binder gegen MUC1 durch den Einsatz stringenter Waschbedingungen. Aus den lediglich $\approx 2 \cdot 10^2$ eluierten Antikörperphagen konnten jedoch insgesamt 28 Sequenz-verschiedene monoklonale Binder isoliert werden. Die Dauer der Inkubation in einem großen Waschkvolumen (3 Wochen), wöchentlich unterbrochen von Waschschritten im ELISA-Washer, kann eine Erklärung für die geringe Zahl an eluierten Antikörperphagen sein. Durch die zeitliche Länge des Panningprozesses erfolgte die Selektion auf verbesserte Affinität, maßgeblich bedingt durch niedrige Dissoziationsraten und gleichzeitig auch auf eine erhöhte Stabilität der Antikörperfragmente. Von den 28 Einzelklonen mit verschiedener Aminosäuresequenz wurden fünf aufgrund eines hohen Messsignals im ELISA für die weitere Charakterisierung ausgewählt.

Ein Nachteil des *Off-rate*-Pannings kann jedoch die durch die Immobilisierung des Antigens an die Kunststoffoberfläche bedingte Anreicherung von Antikörperfragmenten mit gesteigerter Tendenz zur Multimerisierung sein (Schier *et al.*, 1996). An der festen Phase können Bereiche mit erhöhter Antigendichte entstehen, wodurch eine verstärkte Bindung multimerer Antikörperfragmente durch den Aviditätseffekt hervorgerufen werden kann. Diese potentiellen Probleme sollten durch Pannings in Lösung umgangen werden. Die durchgeführten Selektionsstrategien orientierten sich an den Methoden von Hawkins *et al.* (1992) und Schier *et al.* (1996). Die Titer der eluierten Antikörperphagen lagen nach den Selektionsrunden deutlich (bis zu vier Größenordnungen) über den Werten des *Off-rate*-Pannings. Dies kann nicht allein durch die um den Faktor 250 größere Zahl an eingesetzten Antikörperphagenpartikeln für die Selektion begründet sein, sondern muss auch an der geringeren Stringenz der Waschschrritte und möglichen Totvolumina beim Panning in Lösung liegen. Die Reduktion der Konzentration des biotinylierten Antigens von 0,5 nM in

der dritten Runde auf 0,1 nM in der vierten Runde beim Panning in Lösung führte ausschließlich zu der Isolation unspezifischer Einzelklone. Der Effekt einer Anreicherung von unspezifischen Antikörperphagen beim Unterschreiten einer Antikörper-abhängigen, kritischen Antigenkonzentration während der Selektion ist von Schier & Marks (1996) beschrieben worden.

Das Panning in Lösung mit Konkurrenz wurde mit den reamplifizierten Antikörperphagen aus der zweiten Runde des Pannings in Lösung (ohne Konkurrenz) durchgeführt. Durch den 1000fachen Überschuss an Konkurrent und die einwöchige Inkubation zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichts wurden Binder mit niedrigen Dissoziationsraten, die über den gesamten Selektionsprozess an das biotinylierte Antigen gebunden waren, angereichert. Aus den Pannings in Lösung (mit und ohne Konkurrenz) konnten insgesamt acht weitere Einzelklone mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz im Vergleich zu IIB6 scFv isoliert werden.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das *Off-rate*-Panning und das Panning in Lösung für die Anreicherung von höheraffinen Bindern geeignet sind, wenn bestimmte Parameter eingehalten werden. Da die Parameter bei jeder Affinitätsreifung variieren können, ist ein paralleler Einsatz mehrerer Strategien sinnvoll.

Beim Einsatz von Phagen-Display-basierten Selektionssystemen erfolgte neben der Selektion auf die gewünschten Eigenschaften (z. B. erhöhte Affinität) auch automatisch eine Selektion auf eine verbesserte Löslichkeit und Produzierbarkeit der Antikörperfragmente in *E. coli* (Deng *et al.*, 1994; Breitling & Dübel, 1997). Verdünnungsreihen von Produktionsüberständen, die sekretierte scFv-Fragmente enthielten, ermöglichten im Antigen-ELISA eine erste Einschätzung der scFv-Fragmente bezüglich ihrer Affinität zum MUC1-Peptid und ihrer Produzierbarkeit. Dem ELISA-Signal liegt jedoch eine Kombination von Affinität und Produzierbarkeit zu Grunde, so dass eine semi-quantitative Aussage über die Affinität nur durch eine Verdünnungsreihe und den Abgleich der Konzentration der Antikörperfragmente möglich ist. Für den Großteil der affinitätsgereiften Antikörperfragmente wurden signifikant höhere ELISA-Signale im Vergleich mit IIB6 scFv nachgewiesen. Die Expressionsraten der affinitätsgereiften Kandidaten waren nach einer ersten Abschätzung mittels Immuno-Blot mit Ausnahme von HT186-D11 nicht deutlich erhöht. Deshalb konnte anhand dieser ELISA-Ergebnisse bereits auf eine Verbesserung der Antigen-Bindungseigenschaften der meisten affinitätsgereiften Kandidaten geschlossen werden.

Die Oberflächenplasmonresonanz-Analyse von Produktionsüberständen mit sekretierten Antikörperfragmenten erlaubte ein *Ranking* der Kandidaten, da sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationseigenschaften der Binder gemessen und einbezogen werden konnten. Ziel war die Isolation von α -MUC1-Antikörperfragmenten mit möglichst niedrigeren Dissoziationsraten. Die damit zu erwartende längere „Verweilzeit“ am Antigen ist besonders im therapeutischen Bereich vorteilhaft, weil dadurch eine erhöhte Lokalisation der Antikörper am Tumor erreicht werden kann und zudem die pharmakokinetischen Eigenschaften, wie die Tumor/Blut-Verteilung der Antikörper günstig beeinflusst wird (Adams *et al.*, 1998). Dies führt letztlich zu geringeren Antikörperdosen, die den PatientInnen verabreicht werden müssen.

Die sechs affinitätsgereiften Einzelklone, deren Dissoziationskurve eine geringere Abnahme aufwies als die des Ursprungsklons IIB6 scFv, wurden eingehend charakterisiert. Bei allen Klonen

konnten zudem höhere Assoziationsraten an das MUC1-Peptid im Vergleich mit IIB6 scFv festgestellt werden.

Zur Produktion ausreichender Mengen an Antikörperfragmenten für weitere Analysen wurden die scFv-Gene in den Expressionsvektor pOPE101-XP kloniert und anschließend lösliche scFv-Fragmente in *E. coli* produziert. Nach der IMAC-Aufreinigung wurden deutliche Unterschiede in der Ausbeute an Zielprotein pro Liter Kultur nachgewiesen. Da die Ausbeuten der scFv-Fragmente bis zu einem Faktor von vier abwichen, sind diese Ergebnisse nicht ausschließlich mit Schwankungen in der Qualität der Periplasma-Präparation und der IMAC-Aufreinigung zu erklären. Der Austausch weniger Aminosäuren kann signifikanten Einfluss auf die Produktionseigenschaften von Antikörperfragmenten ausüben (Ito *et al.*, 1993). Außerdem nehmen die Codon-usage, die 2D-Struktur der mRNA, die Löslichkeit, die Toxizität und die Faltung des Antikörperfragments Einfluss auf die Expression. Diese Parameter können durch die zufälligen Mutationen sowohl positiv als auch negativ beeinflusst werden.

Der Einsatz definierter scFv-Konzentrationen im Antigen-ELISA machte eine genauere Abschätzung der Affinität der Antikörperfragmente zum MUC1-Peptid möglich. Da aufgereinigte scFv-Fragmente verwendet wurden, konnte die unterschiedliche Produzierbarkeit in dieser Versuchsanordnung als Einflussgröße ausgeschlossen werden. Somit konnten die Bindungseigenschaften der Antikörperfragmente anhand der ELISA-Signale abgeschätzt werden. Für alle affinitätsgereiften Kandidaten konnten in Relation zum IIB6 scFv eine deutlich verbesserte spezifische Bindung an das MUC1-Peptid nachgewiesen werden. Die bisherigen Ergebnisse zur Abschätzung der Affinität wurden durch diesen Versuch bekräftigt.

Die Affinitäten der Antikörperfragmente zum MUC1-Peptid wurden mittels Oberflächenplasmonresonanz ermittelt. Für IIB6 scFv konnte ein K_D -Wert von $3,1 \cdot 10^{-7}$ M bestimmt werden, der damit sehr nah an dem von Toleikis (2004) bestimmten K_D -Wert ($2,3 \cdot 10^{-7}$ M) lag. Die für die affinitätsgereiften scFv-Fragmente gemessenen Affinitäten lagen im Bereich zwischen $4,4 \cdot 10^{-9}$ M und $5,7 \cdot 10^{-10}$ M und entsprechen einem Affinitätszuwachs von einem Faktor bis zu $400\times$ gegenüber dem Ursprungsklon. Die Affinitäten der drei aus dem *Off-rate*-Panning stammenden scFv-Fragmente wurden mit zwei unterschiedlichen Messchips doppelt bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen wichen nur geringfügig voneinander ab, was für die Reproduzierbarkeit der Messungen spricht. Durch den Einsatz sehr geringer Mengen an MUC1-Peptid (Chip 1: $47 \text{ pg (mm}^2\text{)}^{-1}$; Chip2: $14 \text{ pg (mm}^2\text{)}^{-1}$) wurden Aviditäts- und Massetransfereffekte reduziert. Der schnelle Abfall des Messsignals zu Beginn der Dissoziationsphasen lag an Inhomogenitäten der Proben. Geringfügig vorhandene, gebundene Aggregatstrukturen lösten sich nach Ende der Assoziationsphase schnell vom Antigen und sorgten aufgrund ihrer hohen Masse für die rasche Abnahme des Signals. Dieser Effekt wurde durch eine Modifikation des mathematischen Auswertungsmodells kompensiert. Die dadurch entstehende Ungenauigkeit bei der Berechnung der Bindungskonstanten lag jedoch nur bei einem Faktor von maximal 2-3 (Uwe Bierfreund, GE Healthcare, persönliche Mitteilung). Affinitätsbestimmungen mit scFv-Monomerfraktionen nach einer SEC-Aufreinigung waren nicht möglich. Darüber hinaus wurde nicht geklärt, inwieweit sich

nach der Separation von scFv-Monomeren ein erneutes Gleichgewicht zwischen scFv-Monomeren und scFv-Dimeren einstellt. Die für das affinitätsgereifte scFv-Fragment HT186-D11 bestimmte Affinität ist die höchste Affinität, die bislang für die Bindung eines humanen Antikörpers bzw. eines humanen Antikörperfragments an MUC1 gemessen wurde. Die Affinitäten der übrigen scFv-Fragmente lagen zwar unterhalb der von HT186-D11, jedoch immer noch im nanomolaren Bereich.

Affinitäten in dieser Größenordnung wurden bislang nur für die Bindung von Maus-IgG-Antikörpern an MUC1-Abschnitte mit mehreren VNTR-Domänen (Karanikas *et al.*, 1998) oder direkt an MUC1-präsentierende Zellen beschrieben (Danielczyk *et al.*, 2006), wobei es sich dabei meistens um apparente Affinitäten unter Ausnutzung des Aviditätseffekts handelte. Bei dem humanen α -MUC1-Antikörper PH1-IgG1 lag die apparente Affinität um den Faktor 160 höher als die monovalente Affinität des korrespondierenden Fab-Fragments (Henderikx *et al.*, 2002).

Deshalb kann eine Steigerung der apparenten Affinität der affinitätsgereiften scFv-Fragmente nach Di- bzw. Multimerisierung erwartet werden.

Mittels Epitop-Kartierung wurde untersucht, ob sich die antigene Determinante der affinitätsgereiften scFv-Fragmente gegenüber IIB6 scFv verändert hat. Die Epitop-Kartierung erfolgte mit immobilisierten, synthetischen, nicht-glykosylierten MUC1-Peptiden (15 AS), die durch einen Sequenzversatz von je einer Aminosäure die gesamte Sequenz der VNTR-Domäne von MUC1 abdeckten. Als Epitop konnte für alle untersuchten Einzelklone (inkl. IIB6 scFv) die Aminosäuresequenz RPAP ermittelt werden. Anhand dieses Resultats konnte nachgewiesen werden, dass die antigene Determinante durch die Affinitätsreifung nicht verändert wurde und die Feinspezifität der affinitätsgereiften Antikörperfragmente mit der von IIB6 scFv übereinstimmte. Für IIB6 scFv wurde von Toleikis (2004) die Aminosäuresequenz TRPAP als Epitop beschrieben. Die Epitop-Kartierung erfolgte dort mit MUC1-Peptiden (15 AS), die am Threoninrest der Sequenz TRPAP mit N-Acetylgalaktosamin glykosyliert waren. Dies lässt vermuten, dass die Glykosylierung am Threoninrest die antigene Determinante beeinflusst. Da für den Ursprungsclon IIB6 scFv ein äquivalentes Bindungsverhalten im ELISA an glykosyliertes bzw. nicht-glykosyliertes MUC1-Peptid beschrieben wurde (Toleikis, 2004), ist die Glykosylierung für eine Bindung nicht essentiell und es kann spekuliert werden, dass die Glykosylierung nur einen geringen Einfluss auf die Bindung ausübt. Für eine genauere Untersuchung wären weitere Experimente mit glykosylierten und nicht-glykosylierten MUC1-Peptiden und ein *glycine-walk* zur Bestimmung des Beitrags einzelner Aminosäuren zur Antikörperbindung notwendig. (Kneissel *et al.*, 1999)

Das ermittelte Epitop RPAP ist Teil der kurzen hydrophilen Sequenz PDTRPAP, die als wichtigste immunogene Region in den VNTR-Regionen von MUC1 beschrieben wurde (Price *et al.*, 1998; Blockzijl *et al.*, 1998). Die meisten murinen Antikörper, die mittels Hybridoma-Technik gegen MUC1 isoliert wurden, besitzen ihr Epitop in der oben genannten Sequenz, wobei RPAP als häufigstes Epitop beschrieben wurde (Petrakou *et al.*, 1998). Untersuchungen mit dem murinen Antikörper C595 (Epitop **RPAP**) wiesen den initialen Argininrest und den terminalen Prolinrest im Epitop als essentiell für eine Bindung des Antikörpers aus und lassen vermuten, dass diese beiden Aminosäurereste die kritischen Kontaktstellen darstellen (Briggs *et al.*, 1993).

Die ebenfalls durch Phagen-Display generierten humanen Antikörperfragmente 10A scFv und 10B scFv erkennen die Sequenzen PAPG(S) bzw. TRPAPGSTAPPHA der VNTR-Region von unter- bzw. nicht-glykosyliertem MUC1 (Henderikx *et al.*, 1998). Der humane Antikörper PH1-IgG1 basiert auf einem Fab-Fragment, das mittels Phagen-Display gegen MUC1 isoliert wurde und an die Sequenz PAP bindet (Henderikx *et al.*, 2002).

Da die in dieser Arbeit generierten affinitätsgereiften scFv-Fragmente das Epitop RPAP erkennen, kann für sie eine erhöhte Internalisierungsrate vermutet werden, da für Antikörper mit dem Epitop (R) PAP bereits eine erhöhte Internalisierungsrate gezeigt wurde (Henderikx *et al.*, 2002). Speziell für die Antikörper PH1-IgG1 (Epitop: PAP) und hCTMO1 (Epitop: RPAP) wurden effiziente Internalisierungen beschrieben (Henderikx *et al.*, 2002; Pietersz *et al.*, 1997). Auch für den humanisierten Antikörper huHMF1 (Verhoeyen *et al.*, 1993), der an das Epitop PDTR bindet, wurde eine effektive Internalisierung nachgewiesen (Pericleous *et al.*, 2005). Somit erscheint eine effiziente Internalisierung von α -MUC1-Antikörpern nicht ausschließlich vom Epitop abhängig zu sein. Die beschriebenen Internalisierungsraten liegen über denen, die für unterglykosyliertes, nicht Antikörper-gebundenes MUC1 bekannt sind (Altschuler *et al.*, 2000). Eine verstärkte MUC1-Internalisierung könnte durch Antikörperbindung bzw. Antikörper-basierte Quervernetzung von MUC1 erfolgen. Bisher ist nicht klar, ob eine bivalente Bindung an MUC1 eine Voraussetzung für die Internalisierung ist. Die Internalisierung von Antikörpern kann eine tumorspezifische *drug-delivery* zur Behandlung von Adenokarzinomen ermöglichen.

Um zu zeigen, dass die verbesserten Bindungseigenschaften der affinitätsgereiften scFv-Fragmente nicht auf einer erhöhten Dimerisierungsneigung und damit auf Aviditätseffekten beruhen, wurde das Aggregationsverhalten der α -MUC1-Antikörperfragmente mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht. Für den Ursprungsantikörper IIB6 scFv und das affinitätsgereifte scFv-Fragment HT220-M-G8 konnte eine signifikante Neigung zur Ausbildung von Dimeren nachgewiesen werden. Die übrigen affinitätsgereiften scFv-Fragmente wiesen eine geringe Dimer- bzw. Aggregatbildung auf. Ein Einfluss des Linker-Peptids auf das Aggregationsverhalten der scFv-Fragmente ist unwahrscheinlich, da nicht alle affinitätsgereiften Kandidaten Mutationen in diesem Bereich aufwiesen (vgl. Tab. 5.8). HT186-B7 beispielsweise hatte von allen getesteten scFv-Fragmenten die geringste Aggregationsneigung und hatte im Linker-Peptid die exakt gleiche Aminosäureabfolge wie IIB6 scFv oder HT220-M-G8. Somit muss das unterschiedliche Aggregationsverhalten in der eigentlichen Aminosäuresequenz der Antikörperfragmente begründet liegen und zeigt, dass nur wenige Änderungen in der Sequenz die Eigenschaften von Antikörperfragmenten (Affinität, Stabilität, Produzierbarkeit, Toxizität, Immunogenität etc.) stark beeinflussen können (Foote & Winter, 1992; Ito *et al.*, 1993; Jung *et al.*, 2001; Krauss *et al.*, 2004).

Für alle scFv-Fragmente außer HT186-G2 wurden auch höhere Proteinkonzentrationen (bis zu 1,6 mg mL⁻¹) in der SEC eingesetzt, um zu überprüfen, ob eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Dimer- bzw. Aggregatbildung festzustellen ist. Es wurden jedoch nahezu identische Verteilungsprofile im Vergleich mit den weniger stark konzentrierten Proben (400 µg mL⁻¹) nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Somit kann eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der Aggregatbildung für die getesteten scFv in diesen Konzentrationsbereichen ausgeschlossen werden.

Für niedrige Proteinkonzentrationen ($<50 \mu\text{g mL}^{-1}$) konnten diese Messungen nicht durchgeführt werden, da bei der SEC eine starke Verdünnung der Proben auftritt und dann der Messbereich des UV₂₈₀-Detektionssystems unterschritten wird.

Interessanterweise wurde für fünf von sechs untersuchten affinitätsgereiften Kandidaten, unabhängig von der angewandten Panning-Strategie, eine deutlich geringere Dimerbildung nachgewiesen, obwohl der Ursprungsklon IIB6 scFv eine starke Tendenz zur Dimerbildung besitzt. Auch die für das Panning mit immobilisiertem Antigen beschriebene erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Anreicherung von Antikörperfragmenten mit verstärkter Aggregationsneigung (Johnson & Hawkins, 1996; Schier *et al.*, 1996) kann anhand der Daten dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der Nachweis, dass die affinitätsgereiften Antikörperfragmente hauptsächlich als monomere scFv-Fragmente vorlagen, beweist, dass die höheren Affinitäten der affinitätsgereiften α -MUC1-Antikörperfragmente nicht auf Aviditätseffekten beruhen. Im Umkehrschluss kann vermutet werden, dass die Bindungseigenschaften vom IIB6 scFv zu einem nicht unerheblichen Teil auf Aviditätseffekten beruhen. Da tumorzellassoziertes MUC1 viele VNTRs und dadurch viele Epitope enthält, könnte ein IIB6 scFv-*Diabody* durch den Aviditätseffekt eine deutlich stärkere Bindung an dieses MUC1 hervorrufen (z. B. bei der FACS-Analyse) und so trotz geringerer Affinität ähnliche Ergebnisse wie die affinitätsgereiften scFv-Fragmente erreichen.

Für einen Einsatz in Diagnostik und Therapie ist zusätzlich wichtig, dass die verwendeten Antikörper(fragmente) eine hohe Stabilität besitzen (Willuda *et al.*, 1999). Die Stabilität der ausgewählten α -MUC1-Antikörperfragmente wurde nach Inkubation für bis zu 30 Tage bei 37 °C mittels Antigen-ELISA bestimmt. Die biologische Aktivität (in Form von Bindung an das Antigen) nach der Inkubation wurde als Messgröße für die Stabilität herangezogen. Zur Untersuchung der Stabilität wurde die Langzeitinkubation bei 37 °C gewählt, da sie den physiologischen Bedingungen nahe kommt, unter denen die Antikörperfragmente eingesetzt werden könnten. Andere Möglichkeiten zur Stabilitätsüberprüfung wären eine Inkubation in (humanem) Serum bei 37 °C, in Guanidin-HCl, mehrmaliges Einfrieren und Auftauen oder kalorimetrische Methoden (Wörn & Plückthun, 2001; Park *et al.*, 2003; Honegger, 2008).

Für vier scFv-Fragmente (HT186-B7, HT186-D11, HT200-3A-C1 und HT220-M-D1) konnte eine deutlich erhöhte Stabilität bei den gewählten Bedingungen nachgewiesen werden. Für IIB6 scFv hingegen wurde eine sehr geringe Stabilität festgestellt. Lediglich der Klon HT220-M-G8 wies im Vergleich mit den übrigen Kandidaten eine deutlich reduzierte Stabilität auf. Diese Beobachtung korrelierte mit der erhöhten Tendenz zur Dimerbildung von IIB6 scFv und HT220-M-G8. Die stärkere Neigung zur Aggregation führte vermutlich zur Ausbildung von nicht funktionellen Aggregat-Strukturen.

Da bei zwei der angewendeten Panning-Strategien die Waschschrte bzw. die Ausbildung eines Bindungsgleichgewichts über mehrere Tage bis Wochen erfolgte, wurden dadurch scFv-Fragmente selektiert, die eine erhöhte Stabilität aufwiesen. Die Isolierung des Klons HT220-M-G8 nach einer siebentägigen Inkubation könnte deshalb trotz seiner geringen Stabilität an der Temperatur von 4 °C während des Pannings gelegen haben, wodurch die Aggregatbildung vermutlich reduziert war. Um die Anreicherung solcher Klone zu vermeiden, können die Pannings zukünftig bei 37 °C

durchgeführt werden.

Für Antikörperfragmente, deren Stabilität durch einzelne Aminosäureaustausche erhöht wurde, ist auch eine gleichzeitige Erhöhung der Affinität beschrieben worden (McHugh *et al.*, 2002). Ein solcher Effekt kann möglicherweise mit zu den verbesserten Bindungseigenschaften der untersuchten affinitätsgereiften α -MUC1 scFv-Fragmente beitragen. Die gesteigerten Stabilitäten können durch die gleichzeitige Selektion auf diesen Parameter während des Panning-Prozesses erklärt werden. Durch den Austausch einiger Aminosäuren kann möglicherweise auch die Affinität der beiden Ketten der Antikörperfragmente zueinander erhöht worden sein und so zur Stabilisierung beitragen. Da zudem für die meisten affinitätsgereiften Kandidaten eine geringere Neigung zur Aggregation nachgewiesen wurde, ist dies ein weiterer Hinweis auf eine stabile Assemblierung der beiden V-Regionen. Die hohe Stabilität der scFv-Fragmente HT186-B7, HT186-D11, HT200-3A-C1 und HT220-M-D1 erleichtert den Einsatz unter physiologischen Temperaturbedingungen erheblich.

Für einen Einsatz der affinitätsgereiften Antikörperfragmente im therapeutischen Bereich ist die spezifische Bindung an natives, tumorzellassoziertes MUC1 entscheidend. Deshalb wurde überprüft, ob die affinitätsgereiften Antikörperfragmente an tumorassoziertes MUC1 binden. Für mehrere MUC1⁺ Karzinomzelllinien (T47D, MCF-7, SKOV3) konnte eine Bindung der scFv-Fragmente mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

Für die affinitätsgereiften Kandidaten konnte im Vergleich mit IIB6 scFv eine verbesserte Bindung an T47D-Zellen festgestellt werden, während bei der Färbung von MCF-7-Zellen keine Unterschiede nachzuweisen waren. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnten zellspezifische Unterschiede bei der Expression von MUC1 sein. Über den Einfluss der Glykosylierungen auf die Antigen-Erkennung der affinitätsgereiften Klone kann lediglich gemutmaßt werden. So könnte die Zahl der zugänglichen Epitope begrenzt sein, da zumindest für die Zelllinie T47D unterschiedlich starke Glykosylierungsgrade beschrieben wurden (Hanisch *et al.*, 1996) und eine Maskierung der Peptid-Epitope nicht ausgeschlossen werden kann. Zudem könnte eine verstärkte Tendenz zur Dimerbildung (vgl. Abschnitt 5.9) bei IIB6 scFv und HT220-M-G8 und der damit verbundene Aviditätseffekt die Ergebnisse der FACS-Analyse dieser beiden Klone verbessern.

Eine Bindung an SKOV3-Zellen wurde hingegen ausschließlich für einige affinitätsgereifte scFv-Fragmente nachgewiesen. Hier könnte entweder die absolute Menge an exprimiertem MUC1-Antigen oder die Zahl der zugänglichen Epitope derart limitiert sein, dass eine spezifische Zellfärbung nur mit hochaffinen Antikörperfragmenten möglich ist.

Eine unspezifische Bindung an MUC1⁻-HEK293-T-Zellen wurde für HT186-B7 nachgewiesen. Auch für die beiden anderen scFv-Fragmente aus dem *Off-rate*-Panning (HT186-D11, HT186-G2) war eine geringe unspezifische Bindung an diesen Zelltyp feststellbar.

Für die humanen α -MUC1-scFv-Fragmente 10A und 10B und den murinen IgG SM3 wurde die Bindung an T47D-Zellen beschrieben, jedoch war nur eine minimale Bindung an MUC1⁺-MCF-7-Zellen nachweisbar (Henderikx *et al.*, 1998). Weiterhin wurde für den murinen Antikörper HMFG-1 und den humanen Antikörper PH1-IgG1 ein ähnliches Bindungsverhalten auf der Zelllinie T47D und eine sehr schwache Bindung an MCF-7-Zellen nachgewiesen (Henderikx *et al.*,

2002). Beide Antikörper riefen eine geringe unspezifische Hintergrundfärbung auf Jurkat-Zellen hervor (Henderikx *et al.*, 2002). Für den humanisierten α -MUC1-Antikörper huHMFG1 und die von diesem abgeleiteten Fab- und scFv-Fragmente konnten starke Bindungen an SKOV3-Zellen gezeigt werden (Pericleous *et al.*, 2005).

Ein direkter Vergleich mit Durchflusszytometrie-Resultaten anderer Forschungsgruppen ist nur bedingt und unter Vorbehalt möglich, da je nach verwendetem Antikörperformat unterschiedliche Nachweissysteme eingesetzt wurden und zudem die eingesetzten Zelllinien in unterschiedlichen Laboren abweichende Eigenschaften aufweisen können.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die erzeugten affinitätsgereiften humanen α -MUC1-scFv-Fragmente spezifisch an MUC1⁺-Karzinomzellen binden können und Zellfärbungen ermöglichen, die dem Niveau von bekannten α -MUC1 IgG-Antikörpern entsprechen.

Die Sequenzierung der Genabschnitte der isolierten Antikörperfragmente erlaubte neben dem Ausschluss von Einzelklonen mit identischer Sequenz auch die weitere bioinformatische Auswertung der Sequenzdaten. Eine Datenbankabfrage (VBASE2) ermöglichte die Bestimmung von CDR- und *Framework*-Regionen der ausgewählten Antikörperfragmente (Mollova *et al.*, 2007; Retter *et al.*, 2005). Aus Punktmutationen resultierende Aminosäureaustausche konnten auf diese Weise exakt und schnell zugeordnet werden. Die mittlere Mutationsrate lag bei ≈ 14 Punktmutationen im gesamten scFv-Gen, wobei ≈ 50 % der Punktmutationen „stille“ Mutationen waren, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führten. Die Mutationsrate in den untersuchten Klonen lag unterhalb der Mutationsrate, die für zufällig analysierte Klone nach der Bibliothekenherstellung ermittelt wurde. Durch die geringe Größe der jeweiligen Stichproben ($n \leq 9$) sind diese Erkenntnisse bezüglich der Mutationsraten mit einer statistischen Unsicherheit behaftet. Es wurde gezeigt, dass die mittels *Error-prone*-PCR erzielten Mutationsraten (20-30 Punktmutationen pro scFv-Gen) ausreichend sind, um eine Selektion von Bindern mit verbesserter Affinität zu ermöglichen. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Forschungsgruppen (Lutz Jermutus, Cambridge Antibody Technology, persönliche Mitteilung). Es kann spekuliert werden, ob so hohe Mutationsraten tatsächlich benötigt werden oder ob eine geringere Mutationsrate in Kombination mit einer besseren Qualität und höheren Komplexität der Antikörpergenbibliothek nicht eine gleichwertige Alternative darstellt.

Bedingt durch die Zufallsmutagenese fanden sich Mutationen im gesamten Bereich der scFv-Gene. Die Verteilung der Mutationen zeigte bei den affinitätsgereiften Klonen eine Häufung von Aminosäureaustauschen im Bereich V_L-CDR2. Alle untersuchten Sequenzen wiesen dort Abweichungen von der Sequenz des Ursprungsklons IIB6 auf. Bei fünf von sechs Sequenzen konnte der Austausch von Asparaginsäure gegen Glycin oder Asparagin in V_L-CDR2 (YDS \rightarrow G/N) nachgewiesen werden. Es kann vermutet werden, dass diese Position direkten Einfluss auf die Affinität der Antikörperfragmente zum MUC1-Peptid bzw. zum Epitop RPAP hat. Ein genauer Rückschluss, welcher Aminosäureaustausch welchen Einfluss auf das Antikörperfragment hat, ist sehr kompliziert, da bereits der Austausch einer Aminosäure (auch in den *Framework*-Regionen) signifikanten Einfluss auf die Affinität und die Faltung von Antikörperfragmenten haben kann

(Foote & Winter, 1992; Ito *et al.*, 1993; Holmes *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2001; Krauss *et al.*, 2004).

Da für die generierten Antikörperfragmente ein Einsatz im therapeutischen Bereich beabsichtigt ist, kann die Immunogenität der Moleküle im Menschen ein Problem darstellen. Bioinformatische Analysen der Aminosäuresequenzen können Hinweise auf die mögliche Immunogenität der Antikörperfragmente liefern. Die *Humanness*-Analyse (Abhinandan & Martin, 2007) erbrachte jedoch keine eindeutigen Hinweise auf eine erhöhte Immunogenität der affinitätsgereiften scFv-Fragmente im Vergleich mit IIB6 scFv. Auch der Vergleich der Aminosäuresequenzen mit den nächstverwandten Keimbahnsequenzen zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen. Die für die V_H-Domäne ermittelten Homologien zu den Keimbahnsequenzen waren geringer als die der V_L-Domäne. Beide Analyse-Methoden lieferten ähnliche Resultate. Da HT220-M-D1 die meisten Mutationen aller untersuchten scFv-Fragmente enthält, wurden für dieses Antikörperfragment auch die höchsten Abweichungen in beiden Sequenzanalysen festgestellt. Die gewonnenen bioinformatischen Daten können lediglich als Hinweis zur groben Einschätzung der Immunogenität der α -Antikörperfragmente betrachtet werden. Exakte Angaben zur Immunogenität von Antikörpern erfordern klinische Untersuchungen am Menschen (Hwang & Foote, 2005).

Die Existenz potentieller *N*-Glykosylierungsstellen im CDR2-Bereich von V_L der Klone HT200-3A-C1 und HT220-M-D1 kann nach der Produktion dieser Antikörperfragmente in eukaryotischen Expressionssystemen zu Problemen führen, falls die vorhergesagte *N*-Glykosylierungsstelle tatsächlich glykosyliert wird. Dies ist wiederum von der zur Produktion eingesetzten Zelllinie abhängig. Für den Fall, dass eine Glykosylierung erfolgt, kann es zu sterischen Behinderungen der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen kommen, da sich die Glykosylierungsstellen der beiden Antikörperfragmente direkt im CDR-Bereich befinden. Somit müssten Antikörper, welche auf den Klonen HT200-3A-C1 oder HT220-M-D1 basieren und mit Hilfe eukaryotischer Expressionssysteme hergestellt wurden, stets bezüglich der Glykosylierung ihrer potentiellen *N*-Glykosylierungsstelle untersucht werden. Zusätzlich müsste die Struktur der Zuckerketten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Antikörper-Antigen Interaktion analysiert werden.

Alternativ könnten die möglichen Glykosylierungsstellen mittels gerichteter Mutagenese zurück zur Ausgangssequenz ($N \rightarrow Y$) mutiert werden. In diesem Fall wäre erneut eine komplette Charakterisierung der Antikörperfragmente bezüglich ihrer Affinität, Spezifität und Stabilität erforderlich.

6.2 Multimerisierung von scFv-Fragmenten

Durch Di- bzw. Multimerisierung von Antikörperfragmenten kann deren apparente Affinität durch den Aviditätseffekt erheblich gesteigert werden. In der Natur wird dieser Effekt bei IgM-Antikörpern besonders stark ausgenutzt. Nicht affinitätsgereifte IgM-Antikörper erhalten als

Pentamer aufgrund ihrer zehn Bindungsstellen eine erheblich gesteigerte apparente Affinität (Janeway *et al.*, 2002). Bereits affinitätsgereifte bivalente IgG-Antikörper haben häufig eine mehr als 100fach höhere apparente Affinität als ihre korrespondierenden Fab-Fragmente (Abbas *et al.*, 1996).

Rekombinante Antikörperfragmente, die aus naiven Antikörpergenbibliotheken gewonnen wurden, besitzen oftmals bedingt durch ihre Monovalenz eine geringe funktionelle Affinität. In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Strategien zur direkten Di- bzw. Multimerisierung von Antikörperfragmenten untersucht.

Die angewendeten Strategien basierten auf der Fusion der scFv-Fragmente mit Multimerisierungsvermittlern. Ziel war es, die Antikörperfragmente weiterhin im *E. coli*-System produzieren zu können und den Einsatz von eukaryotischen Expressionssystemen zu vermeiden. Somit wurde auf die Erzeugung von scFv-Fc-Fusionen und einen Wechsel in das IgG-Format verzichtet.

Als Modellantikörper dienten die MUC1-spezifischen scFv-Fragmente IIB6, HT186-D11 und das Lysozym-spezifische scFv-Fragment D1.3. Die Gene der Multimerisierungsdomänen wurden in Antikörper-Expressionsvektoren kloniert und erlaubten die Expression von Fusionsproteinen, die aus einem scFv-Fragment mit einer C-terminalen Multimerisierungsdomäne bestanden. Es wurden die amphipatischen Helices dHLX (Plückthun & Pack, 1997), ZIP (Pack *et al.*, 1993) und TetraZIP (Pack *et al.*, 1995), die Oligomerisierungsdomäne von p53 (Rheinhecker *et al.*, 1996) und eine Biotin-Akzeptordomäne (BAD) (Schatz, 1993; Cloutier *et al.*, 2000) zur *in vivo* Biotinylierung der Antikörperfragmente eingesetzt.

Die verwendeten Multimerisierungsdomänen übten einen deutlichen Einfluss auf die Produzierbarkeit der Antikörperfragmente in *E. coli* aus. Die dHLX-Domäne führte zur Reduktion der *E. coli*-Produktionsausbeute um >95 %, obwohl nur eine Verringerung der Produktionsrate um 20 - 50 % beschrieben ist (Plückthun & Pack, 1997). Die p53-Domäne führte sogar zu einem Rückgang der Produktion um >99 %, obwohl für diese Domäne eine Reduktion der Produktionsausbeute um maximal Faktor acht publiziert und noch 250 µg Zielprotein pro Liter Kulturvolumen erhalten wurde (Willuda *et al.*, 2001). Mit TetraZIP-Fusionen konnten keine ausreichenden Ausbeuten erzielt werden, um weitere Versuche durchführen zu können. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheinen die Literaturangaben die optimalen Ausbeuten für bestimmte Antikörperfragmente unter optimierten Produktionsbedingungen zu sein und sind nicht direkt auf andere Antikörper oder gar Antikörpergenbibliotheken anwendbar.

Da insgesamt drei verschiedene Antikörperfragmente mit den Multimerisierungsdomänen fusioniert wurden und die drastische Reduktion der Produktionsausbeute für alle Antikörperfragmente nachgewiesen wurde, konnte der alleinige Einfluss der scFv-Fragmente auf die *E. coli* Produktion ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung für die Effekte könnte sein, dass die Multimerisierungsdomänen eine effiziente Translokation der Fusionsproteine durch die innere Membran von *E. coli* verhinderten, da in der unlöslichen intrazellulären Fraktion große Mengen Zielprotein vorlagen (Daten nicht gezeigt). Auch ein negativer Einfluss der Multimerisierungsdomänen auf die Faltung von funktionellen scFv-Multimeren konnte nicht ausgeschlossen werden. Die teilweise sehr geringen Ausbeuten an funktionellen scFv-Multimeren erschwerten die Analyse und den

Vergleich der verschiedenen Varianten.

Trotzdem konnte nachgewiesen werden, dass scFv-Multimere generell besser binden als scFv-Monomere, eine genaue Quantifizierung des Aviditätseffekts in Abhängigkeit vom Grad der Oligomerisierung (Tetramer oder Dimer) war hingegen schwierig. Die Resultate von D1.3 und den beiden α -MUC1-Antikörperfragmenten waren in diesem Punkt nicht eindeutig. Für die hochaffinen Antikörperfragmente D1.3 scFv und HT186-D11 wurden im ELISA relative Steigerungen der apparenten Affinität durch Multimerisierung um den Faktor 5 erzielt und für IIB6 scFv relative Steigerungen bis zu einem Faktor 25. Möglicherweise spielt die Affinität des Ausgangs-Antikörperfragments eine entscheidende Rolle bei der Steigerung der apparenten Affinität durch Di- bzw. Multimerisierung. Nielsen *et al.* (2000) konnten zeigen, dass scFv-Fragmente nach der Dimerisierung ähnliche *On-rates* wie die korrespondierenden Monomere besitzen und lediglich die *Off-rates* niedriger waren. Die Steigerung der apparenten Affinität durch die Dimerisierung beruhte demnach auf geringeren *Off-rates*. Die Verbesserung der *Off-rates* der Dimere war dabei stark von der Affinität des monomeren scFv-Fragmentes abhängig, da hochaffine Antikörperfragmente oftmals bereits niedrige *Off-rates* besitzen und dann durch Multimerisierung nur vergleichbar geringe Verbesserungen der *Off-rate* erzielt werden können. Diese Daten deckten sich mit den Resultaten dieser Arbeit.

Der Unterschied im Bindungsverhalten der beiden monomeren scFv-Varianten (ohne Domäne und BAD-Domäne) war auffällig und könnte durch die Maskierung des zum Nachweis genutzten His₆-Tag durch die BAD-Domäne begründet sein. Diesem Argument steht jedoch eine erfolgreich durchgeführte IMAC-Aufreinigung der *in vivo* biotinylierten scFv-Fragmente gegenüber.

Ebenso könnte eine geringfügig veränderte Faltung der Antikörperfragmente durch die BAD-Domäne hervorgerufen worden sein und so das Bindungsverhalten beeinflusst haben.

Generell stellt die *in vivo*-Biotinylierung eine elegante Möglichkeit zur Erzeugung von multimeren Antikörperfragmenten dar. Eine Multimerisierung kann nach Bedarf durch Zugabe von Streptavidin erfolgen; zudem werden Expressionsraten von scFv-Fragmenten mit BAD-Domäne im Vergleich zu anderen Multimerisierungsdomänen am wenigsten negativ beeinflusst.

Für alle getesteten Multimerisierungsdomänen konnte mit verschiedenen Antikörperformaten des α -Lysozym-Antikörpers D1.3 die prinzipielle Kompatibilität mit dem Phagen-Display nachgewiesen werden. Auffällig war, dass der relative Einfluss der Multimerisierungsdomänen auf die Bindungseigenschaften der löslichen Antikörperfragmente umgekehrt proportional zum Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Antikörperphagen war. Dabei wurde für ZIP, TetraZIP und p53 eine geringere Bindung der Antikörperphagen an Lysozym verzeichnet. Da bei diesen Multimerisierungsdomänen die Präsentation der Antikörperfragmente auf den Phagen deutlich geringer war (Daten nicht gezeigt), kann dieses Phänomen erklärt werden. Interessanterweise ist für die ZIP-Domäne beschrieben, dass sie zu einer Multimerisierung von Antikörperfragmenten auf den Phagen führt (Lee *et al.*, 2004). Daraus sollte aviditätsbedingt eine verbesserte Antigenbindung resultieren (Rondot *et al.*, 2001). Diese Resultate stehen im Widerspruch zu den Literaturangaben, wobei nicht nachgewiesen konnte, dass bei der Verwendung der ZIP-Domäne

im vorliegenden Fall tatsächlich eine Multimerisierung der Antikörperfragmente auf den Phagen erfolgte.

Die Anwendung von Antikörperfragmenten mit Multimerisierungsdomänen ist im therapeutischen Bereich unüblich, da die Multimerisierungsdomänen (mit Ausnahme von p53) nicht humanen Ursprungs und damit immunogen sind. Eine Konvertierung von Antikörperfragmenten in das IgG-Format ist für den therapeutischen Einsatz bislang die gängigste Methode. Für den Einsatz in Forschung und Diagnostik hingegen können Multimerisierungsdomänen ein wertvolles Werkzeug zur Steigerung der apparenten Affinität sein. Zudem kann eine Abschätzung der zu erwartenden Steigerung der apparenten Affinität durch Dimerisierung (z. B. *Minibodies*, scFv-Fc-Fusion, IgG) getroffen werden.

6.3 Fazit

Die Affinitätsreifung des MUC1-spezifischen Antikörperfragments IIB6 scFv mittels Zufallsmutagenese durch *Error-prone*-PCR und unterschiedlicher Panningstrategien unter stringenten Bedingungen führte zur Generierung von hochaffinen humanen α -MUC1 scFv-Fragmenten. Die Steigerung der Affinität bis in den subnanomolaren Bereich beim Klon HT186-D11 verspricht Potential für eine Anwendung im therapeutischen Bereich. Neben der Affinität konnten die Stabilität und das Aggregationsverhalten der meisten affinitätsgereiften α -MUC1 Antikörperfragmente verbessert werden. Eine Veränderung des Epitops wurde für keinen Kandidaten im Vergleich zu IIB6 scFv nachgewiesen. Durch Di- bzw. Multimerisierung konnte die apparente Affinität von scFv-Fragmenten um maximal den Faktor 25 erhöht werden.

Unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ergibt sich für die affinitätsgereiften α -MUC1 Antikörperfragmente folgende Rangfolge für einen möglichen Einsatz zur Therapie und Diagnostik von Adenokarzinomen: HT186-D11 > HT186-B7 = HT186-G2 > HT220-M-G8 > HT200-3A-C1* = HT220-M-D1* (* auf Grund der potentiellen *N*-Glykosylierungsstellen). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden zur Affinitätsreifung von Antikörperfragmenten sind kompatibel zu den bestehenden und im Einsatz befindlichen naiven Antikörpergenbibliotheken HAL4/7. Eine Affinitätsreifung kann damit dem Panningprozess direkt nachgeschaltet werden. Gleiches gilt für die untersuchten Multimerisierungsdomänen, die ebenfalls mit allen Antikörperfragmenten aus der HAL4/7 Bibliothek verwendet werden können.

7 Ausblick

Die in dieser Arbeit erzeugten α -MUC1-Antikörperfragmente weisen besondere Eigenschaften, wie eine hohe Affinität und eine hohe Stabilität auf, die sie für den Einsatz in der Diagnostik und Therapie von Adenokarzinomen prädestinieren.

Für eine zukünftige Anwendung im klinischen Bereich müssen die ausgewählten Antikörperfragmente (HT186-D11, HT186-B7, HT186-G2) jedoch weiter untersucht werden. Hierzu müssen die scFv-Fragmente in das IgG- bzw. das scFv-Fc-Format konvertiert werden. Mit diesen neuen Antikörpervarianten sollten Analysen bezüglich ihrer apparenten Affinität zu MUC1 und ihrer Spezifität durchgeführt werden.

Mit dem Ausgangsantikörperfragment IIB6 scFv waren spezifische immunhistochemische Färbungen bei mehr als 80 % von 228 getesteten Tumorgewebspräparaten möglich (Tolékis *et al.*, 2006). Der bereits für die Behandlung von Brustkrebs zugelassene Antikörper Trastuzumab bindet dagegen lediglich an 25–30 % aller Mammakarzinomgewebe. Die drei oben genannten affinitäts-gereiften α -MUC1-Antikörperfragmente und ihre IgG- bzw. scFv-Fc-Derivate müssen ebenfalls auf die spezifische Bindung an Tumorgewebe immunhistochemisch untersucht werden. Zusätzlich sind weitere durchflusszytometrische Messungen mit anderen MUC1⁺- und MUC1⁻-Zelllinien erforderlich. Darüber hinaus muss die Serumstabilität bestimmt werden, um weitere Hinweise auf das Verhalten der Antikörper unter physiologischen Bedingungen zu erhalten.

Zur Bestimmung der Antitumorwirkung der α -MUC1-Antikörper sollten zunächst ADCC-Assays *in vitro* mit Tumorzellen erfolgen und im Anschluss im Tiermodell (*Xenograft*) das therapeutische Antitumorpotential der Antikörper weitergehend validiert werden. Hierzu können chimäre IgG-Antikörper (z. B. mit konstanten Domänen murinen Ursprungs), basierend auf den isolierten scFv-Fragmenten, erzeugt und im Tiermodell untersucht werden. Ebenfalls ist die Fusion der Antikörper mit toxischen Proteinen oder die Kopplung radioaktiver Substanzen zur Bekämpfung von Tumoren möglich.

8 Quellenverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S.: 2007, *Cellular and Molecular Immunology*, 6. Auflage, Saunders.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pober, J. S.: 1996, *Immunologie*, Verlag Hans Huber.
- Abhinandan, K. R. & Martin, A. C. R.: 2007, Analyzing the “degree of humanness” of antibody sequences., *J Mol Biol* **369**(3), 852–862.
- Adams, G. P., Schier, R., Marshall, K., Wolf, E. J., McCall, A. M., Marks, J. D. & Weiner, L. M.: 1998, Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain fv antibodies., *Cancer Res* **58**(3), 485–490.
- Albrecht, H., Burke, P. A., Natarajan, A., Xiong, C.-Y., Kalicinsky, M., DeNardo, G. L. & DeNardo, S. J.: 2004, Production of soluble scFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric scFvs on demand., *Bioconjug Chem* **15**(1), 16–26.
- Altschuler, Y., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Bruns, J. B., Apodaca, G., Weisz, O. A. & Hughey, R. P.: 2000, Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state., *Mol Biol Cell* **11**(3), 819–831.
- Barbas, C. F., Kang, A. S., Lerner, R. A. & Benkovic, S. J.: 1991, Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene iii site., *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(18), 7978–7982.
- Beckman, R. A., Weiner, L. M. & Davis, H. M.: 2007, Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors., *Cancer* **109**(2), 170–179.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. & Whitlow, M.: 1988, Single-chain antigen-binding proteins., *Science* **242**(4877), 423–426.
- Blockzijl, A., Nilsson, K. & Nilsson, O.: 1998, Epitope characterization of MUC1 antibodies., *Tumour Biol* **19 Suppl 1**, 46–56.
- Breitling, F. & Dübel, S.: 1997, *Rekombinante Antikörper*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Breitling, F., Dübel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I. & Little, M.: 1991, A surface expression vector for antibody screening., *Gene* **104**(2), 147–153.
- Briggs, S., Price, M. R. & Tendler, S. J.: 1993, Fine specificity of antibody recognition of carcinoma-associated epithelial mucins: antibody binding to synthetic peptide epitopes., *Eur J Cancer* **29A**(2), 230–237.

- Brockhausen, I., Yang, J. M., Burchell, J., Whitehouse, C. & Taylor-Papadimitriou, J.: 1995, Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells., *Eur J Biochem* **233**(2), 607–617.
- Burchell, J. M., Mungul, A. & Taylor-Papadimitriou, J.: 2001, O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy., *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**(3), 355–364.
- Burchell, J., Poulsom, R., Hanby, A., Whitehouse, C., Cooper, L., Clausen, H., Miles, D. & Taylor-Papadimitriou, J.: 1999, An alpha2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas., *Glycobiology* **9**(12), 1307–1311.
- Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Boshell, M., Gendler, S. & Duhig, T.: 1989, A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes., *Int J Cancer* **44**(4), 691–696.
- Carraway, K. L., Ramsauer, V. P., Haq, B. & Carraway, C. A. C.: 2003, Cell signaling through membrane mucins., *Bioessays* **25**(1), 66–71.
- Carrier, A., Ducancel, F., Settiawan, N. B., Cattolico, L., Maillère, B., Léonetti, M., Drevet, P., Ménez, A. & Boulain, J. C.: 1995, Recombinant antibody-alkaline phosphatase conjugates for diagnosis of human iggs: application to anti-hbsag detection., *J Immunol Methods* **181**(2), 177–186.
- Chasteen, L., Ayriss, J., Pavlik, P. & Bradbury, A. R. M.: 2006, Eliminating helper phage from phage display., *Nucleic Acids Res* **34**(21), e145.
- Chowdhury, P. S. & Pastan, I.: 1999, Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro., *Nat Biotechnol* **17**(6), 568–572.
- Cirino, P. C., Mayer, K. M. & Umeno, D.: 2003, Generating mutant libraries using error-prone PCR., *Methods Mol Biol* **231**, 3–9.
- Clackson, T., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. & Winter, G.: 1991, Making antibody fragments using phage display libraries., *Nature* **352**(6336), 624–628.
- Cloutier, S. M., Couty, S., Terskikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnières, M., Mani, J. C., Leisinger, H. J., Mach, J. P. & Deperthes, D.: 2000, Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin., *Mol Immunol* **37**(17), 1067–1077.
- Coia, G., Hudson, P. J. & Irving, R. A.: 2001, Protein affinity maturation in vivo using E. coli mutator cells., *J Immunol Methods* **251**(1-2), 187–193.
- Danielczyk, A., Stahn, R., Faulstich, D., Löffler, A., Märten, A., Karsten, U. & Goletz, S.: 2006, PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody., *Cancer Immunol Immunother* **55**(11), 1337–1347.

- Daugherty, P. S., Chen, G., Iverson, B. L. & Georgiou, G.: 2000, Quantitative analysis of the effect of the mutation frequency on the affinity maturation of single chain Fv antibodies., *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5), 2029–2034.
- de Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A., Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruijne, A. P., Arends, J. W. & Hoogenboom, H. R.: 1999, A large non-immunized human fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies., *J Biol Chem* **274**(26), 18218–18230.
- de Kruif, J. & Logtenberg, T.: 1996, Leucine zipper dimerized bivalent and bispecific scFv antibodies from a semi-synthetic antibody phage display library., *J Biol Chem* **271**(13), 7630–7634.
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L. & Lasken, R. S.: 2001, Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification., *Genome Res* **11**(6), 1095–1099.
- Deng, S. J., MacKenzie, C. R., Sadowska, J., Michniewicz, J., Young, N. M., Bundle, D. R. & Narang, S. A.: 1994, Selection of antibody single-chain variable fragments with improved carbohydrate binding by phage display., *J Biol Chem* **269**(13), 9533–9538.
- Deyev, S. M., Waibel, R., Lebedenko, E. N., Schubiger, A. P. & Plückthun, A.: 2003, Design of multivalent complexes using the barnase*barstar module., *Nat Biotechnol* **21**(12), 1486–1492.
- d’Hérelle, F. H.: 1917, Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques., *C R Ac Sciences* **165**(10), 373.
- Dübel, S.: 1999, Reconstruction of human pancreatic RNase from two separate fragments fused to different single chain antibody fragments: On the way to binary immunotoxins., *Tumor Targeting* **4**, 37–46.
- Dübel, S.: 2007, Therapeutic Antibodies - From Past to Future, in Dübel, S. (Ed.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Wiley-VCH, pp. 3–16.
- Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A. & Little, M.: 1995, Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv)., *J Immunol Methods* **178**(2), 201–209.
- Dübel, S. & Kontermann, R. E.: 2001, Recombinant Antibodies, in Kontermann, R. E. & Dübel, S. (Eds.), *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, pp. 3–16.
- Fermér, C., Andersson, I., Nilsson, K. & Nilsson, O.: 2004, Specificity rescue and affinity maturation of a low-affinity IgM antibody against pro-gastrin-releasing peptide using phage display and DNA shuffling., *Tumour Biol* **25**(1-2), 7–13.
- Filpula, D. & McGuire, J.: 1999, Single-chain Fv designs for protein, cell and gene therapeutics, *Exp Opin Ther Patents* **9**, 231–245.

- Foote, J. & Winter, G.: 1992, Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops., *J Mol Biol* **224**(2), 487–499.
- Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L. & Goldberg, M. E.: 1985, Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay., *J Immunol Methods* **77**(2), 305–319.
- Fromant, M., Blanquet, S. & Plateau, P.: 1995, Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction., *Anal Biochem* **224**(1), 347–353.
- Fujii, R., Kitaoka, M. & Hayashi, K.: 2004, One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification., *Nucleic Acids Res* **32**(19), e145.
- Gall, F. L., Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G. & Little, M.: 1999, Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding., *FEBS Lett* **453**(1-2), 164–168.
- Gendler, S. J., Burchell, J. M., Duhig, T., Lamport, D., White, R., Parker, M. & Taylor-Papadimitriou, J.: 1987, Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium., *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(17), 6060–6064.
- Gendler, S. J., Lancaster, C. A., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Lalani, E. N. & Wilson, D.: 1990, Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin., *J Biol Chem* **265**(25), 15286–15293.
- Gendler, S. J. & Spicer, A. P.: 1995, Epithelial mucin genes., *Annu Rev Physiol* **57**, 607–634.
- Gendler, S. J., Spicer, A. P., Lalani, E. N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M. & Taylor-Papadimitriou, J.: 1991, Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1., *Am Rev Respir Dis* **144**(3 Pt 2), S42–S47.
- Gendler, S., Taylor-Papadimitriou, J., Duhig, T., Rothbard, J. & Burchell, J.: 1988, A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats., *J Biol Chem* **263**(26), 12820–12823.
- Girling, A., Bartkova, J., Burchell, J., Gendler, S., Gillett, C. & Taylor-Papadimitriou, J.: 1989, A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas., *Int J Cancer* **43**(6), 1072–1076.
- Graff, C. P., Chester, K., Begent, R. & Wittrup, K. D.: 2004, Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 degrees C., *Protein Eng Des Sel* **17**(4), 293–304.
- Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Marks, J. D., Bye, J. M., Embleton, M. J., McCafferty, J., Baier, M., Holliger, K. P., Gorick, B. D. & Hughes-Jones, N. C.: 1993, Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries., *EMBO J* **12**(2), 725–734.

- Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R. & Kranz, D. M.: 1994, Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*., *J Immunol* **152**(11), 5368–5374.
- Hanisch, F. G. & Müller, S.: 2000, MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin., *Glycobiology* **10**(5), 439–449.
- Hanisch, F. G., Müller, S., Hassan, H., Clausen, H., Zachara, N., Gooley, A. A., Paulsen, H., Alving, K. & Peter-Katalinic, J.: 1999, Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions., *J Biol Chem* **274**(15), 9946–9954.
- Hanisch, F. G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, U. & Uhlenbruck, G.: 1990, Structures of acidic O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins., *Glycoconj J* **7**(6), 525–543.
- Hanisch, F. G., Stadie, T. R., Deutzmann, F. & Peter-Katalinic, J.: 1996, MUC1 glycoforms in breast cancer–cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation., *Eur J Biochem* **236**(1), 318–327.
- Hanisch, F. G., Uhlenbruck, G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, J. & Dabrowski, U.: 1989, Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetylactosamine backbones with Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units., *J Biol Chem* **264**(2), 872–883.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G.: 1992, Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation., *J Mol Biol* **226**(3), 889–896.
- Hefta, L. J., Wu, A. M., Neumaier, M. & Shively, J. E.: 1996, Measuring antibody affinity using biosensors, in McCafferty, J., Hoogenboom, H. & Chiswell, D. (Eds.), *A Practical Approach: Antibody Engineering*, IRL Press, pp. 99–117.
- Henderikx, P., Kandilogiannaki, M., Petrarca, C., von Mensdorff-Pouilly, S., Hilgers, J. H., Krambovitis, E., Arends, J. W. & Hoogenboom, H. R.: 1998, Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma., *Cancer Res* **58**(19), 4324–4332.
- Henderikx, P., van Neer, N. C., Jacobs, A., van der Linden, E., Arends, J.-W., Müllberg, J. & Hoogenboom, H. R.: 2002, A human immunoglobulin G1 antibody originating from an in vitro-selected Fab phage antibody binds avidly to tumor-associated MUC1 and is efficiently internalized., *Am J Pathol* **160**(5), 1597–1608.
- Hilkens, J., Kroezen, V., Bonfrer, J. M., Jong-Bakker, M. D. & Bruning, P. F.: 1986, MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring., *Cancer Res* **46**(5), 2582–2587.

- Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G.: 1993, "diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments., *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(14), 6444–6448.
- Hollingsworth, M. A. & Swanson, B. J.: 2004, Mucins in cancer: protection and control of the cell surface., *Nat Rev Cancer* **4**(1), 45–60.
- Holmes, M. A., Buss, T. N. & Foote, J.: 2001, Structural effects of framework mutations on a humanized anti-lysozyme antibody., *J Immunol* **167**(1), 296–301.
- Honegger, A.: 2008, Engineering antibodies for stability and efficient folding., *Handb Exp Pharmacol* (181), 47–68.
- Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P. & Winter, G.: 1991, Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains., *Nucleic Acids Res* **19**(15), 4133–4137.
- Hoogenboom, H. R. & Winter, G.: 1992, By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro., *J Mol Biol* **227**(2), 381–388.
- Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L. E., Wong, J. Y., Shively, J. E. & Wu, A. M.: 1996, Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts., *Cancer Res* **56**(13), 3055–3061.
- Hudis, C. A.: 2007, Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice., *N Engl J Med* **357**(1), 39–51.
- Hudson, P. J. & Kortt, A. A.: 1999, High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies., *J Immunol Methods* **231**(1-2), 177–189.
- Hull, S. R., Bright, A., Carraway, K. L., Abe, M., Hayes, D. F. & Kufe, D. W.: 1989, Oligosaccharide differences in the DF3 sialomucin antigen from normal human milk and the BT-20 human breast carcinoma cell line., *Cancer Commun* **1**(4), 261–267.
- Hust, M., Dübel, S. & Schirrmann, T.: 2007b, Selection of recombinant antibodies from antibody gene libraries., *Methods Mol Biol* **408**, 243–255.
- Hust, M., Maiss, E., Jacobsen, H.-J. & Reinard, T.: 2002, The production of a genus-specific recombinant antibody (scFv) using a recombinant potyvirus protease., *J Virol Methods* **106**(2), 225–233.
- Hust, M., Toleikis, L. & Dübel, S.: 2007a, Selection Strategies II: Antibody Phage Display, in Dübel, S. (Ed.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Wiley-VCH, pp. 45–68.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E. & Crea, R.: 1988, Protein engineering of antibody

- binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*., *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(16), 5879–5883.
- Hwang, W. Y. K. & Foote, J.: 2005, Immunogenicity of engineered antibodies., *Methods* **36**(1), 3–10.
- Iliades, P., Kortt, A. A. & Hudson, P. J.: 1997, Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers., *FEBS Lett* **409**(3), 437–441.
- Irving, R. A., Kortt, A. A. & Hudson, P. J.: 1996, Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells., *Immunotechnology* **2**(2), 127–143.
- Ito, W., Iba, Y. & Kurosawa, Y.: 1993, Effects of substitutions of closely related amino acids at the contact surface in an antigen-antibody complex on thermodynamic parameters., *J Biol Chem* **268**(22), 16639–16647.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M.: 2002, *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Johnson, K. S. & Hawkins, R. E.: 1996, Affinity maturation of antibodies using phage display, in McCafferty, J., Hoogenboom, H. & Chiswell, D. (Eds.), *A Practical Approach: Antibody Engineering*, IRL Press, pp. 41–58.
- Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, A., Pugliese, L., Cambillau, C. & Plückthun, A.: 2001, The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V(H) domains., *J Mol Biol* **309**(3), 701–716.
- Karanikas, V., Patton, K., Jamieson, G., Pietersz, G. & McKenzie, I.: 1998, Affinity of antibodies to MUC1 antigens., *Tumour Biol* **19 Suppl 1**, 71–78.
- Karlsson, R., Fägerstam, L., Nilshans, H. & Persson, B.: 1993, Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters., *J Immunol Methods* **166**(1), 75–84.
- Karush, F.: 1970, Affinity and the immune response., *Ann N Y Acad Sci* **169**(1), 56–64.
- Köhler, G. & Milstein, C.: 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity., *Nature* **256**(5517), 495–497.
- Kipriyanov, S. M., Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R. E. & Little, M.: 1994, Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies., *Mol Immunol* **31**(14), 1047–1058.
- Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., Schuhmacher, J., Cochlovius, B., der Lieth, C. W. V., Matys, E. R. & Little, M.: 1999, Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics., *J Mol Biol* **293**(1), 41–56.

- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B.: 2000, Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides., *J Mol Biol* **296**(1), 57–86.
- Kneissel, S., Queitsch, I., Petersen, G., Behrsing, O., Micheel, B. & Dübel, S.: 1999, Epitope structures recognised by antibodies against the major coat protein (g8p) of filamentous bacteriophage fd (inoviridae)., *J Mol Biol* **288**(1), 21–28.
- Kortt, A. A., Dolezal, O., Power, B. E. & Hudson, P. J.: 2001, Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting., *Biomol Eng* **18**(3), 95–108.
- Kostelny, S. A., Cole, M. S. & Tso, J. Y.: 1992, Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers., *J Immunol* **148**(5), 1547–1553.
- Kotera, Y., Fontenot, J. D., Pecher, G., Metzgar, R. S. & Finn, O. J.: 1994, Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC-1 in sera from breast, pancreatic, and colon cancer patients., *Cancer Res* **54**(11), 2856–2860.
- Krauss, J., Arndt, M. A. E., Zhu, Z., Newton, D. L., Vu, B. K., Choudhry, V., Darbha, R., Ji, X., Courtenay-Luck, N. S., Deonarain, M. P., Richards, J. & Rybak, S. M.: 2004, Impact of antibody framework residue VH-71 on the stability of a humanised anti-MUC1 scFv and derived immunoenzyme., *Br J Cancer* **90**(9), 1863–1870.
- Kurucz, I., Titus, J. A., Jost, C. R., Jacobus, C. M. & Segal, D. M.: 1995, Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria., *J Immunol* **154**(9), 4576–4582.
- Laemmli, U. K.: 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **227**(5259), 680–685.
- Lagow, E., DeSouza, M. M. & Carson, D. D.: 1999, Mammalian reproductive tract mucins., *Hum Reprod Update* **5**(4), 280–292.
- Lee, C. V., Sidhu, S. S. & Fuh, G.: 2004, Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin., *J Immunol Methods* **284**(1-2), 119–132.
- Liddell, E. & Weeks, I.: 1996, *Antikörper-Techniken*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lillehoj, E. P., Kim, B. T. & Kim, K. C.: 2002, Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**(4), L751–L756.
- Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W. & Taylor-Papadimitriou, J.: 1996, Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells., *J Biol Chem* **271**(52), 33325–33334.

- Low, N. M., Holliger, P. H. & Winter, G.: 1996, Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain., *J Mol Biol* **260**(3), 359–368.
- Malmborg, A. C., Dueñas, M., Ohlin, M., Söderlind, E. & Borrebaeck, C. A.: 1996, Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor., *J Immunol Methods* **198**(1), 51–57.
- Maraveyas, A., Snook, D., Hird, V., Kosmas, C., Meares, C. F., Lambert, H. E. & Epenetos, A. A.: 1994, Pharmacokinetics and toxicity of an yttrium-90-CITC-DTPA-HMFG1 radioimmunoconjugate for intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer., *Cancer* **73**(3 Suppl), 1067–1075.
- Marks, J. D., Griffiths, A. D., Malmqvist, M., Clackson, T. P., Bye, J. M. & Winter, G.: 1992, By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling., *Biotechnology (N Y)* **10**(7), 779–783.
- Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D. & Winter, G.: 1991, By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage., *J Mol Biol* **222**(3), 581–597.
- Martineau, P.: 2002, Error-prone polymerase chain reaction for modification of scFvs., *Methods Mol Biol* **178**, 287–294.
- McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J.: 1990, Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains., *Nature* **348**(6301), 552–554.
- McHugh, L., Hu, S., Lee, B. K., Santora, K., Kennedy, P. E., Berger, E. A., Pastan, I. & Hammer, D. H.: 2002, Increased affinity and stability of an anti-HIV-1 envelope immunotoxin by structure-based mutagenesis., *J Biol Chem* **277**(37), 34383–34390.
- McPherson, K., Steel, C. M. & Dixon, J. M.: 2000, ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics., *BMJ* **321**(7261), 624–628.
- Mollova, S., Retter, I. & Müller, W.: 2007, Visualising the immune repertoire, *BMC Systems Biology* **1**(Suppl 1):P30.
- Müller, K. M., Arndt, K. M. & Plückthun, A.: 1998a, A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity., *FEBS Lett* **432**(1-2), 45–49.
- Müller, K. M., Arndt, K. M. & Plückthun, A.: 1998b, Model and simulation of multivalent binding to fixed ligands., *Anal Biochem* **261**(2), 149–158.
- Müller, S., Alving, K., Peter-Katalinic, J., Zachara, N., Gooley, A. A. & Hanisch, F. G.: 1999, High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells., *J Biol Chem* **274**(26), 18165–18172.

- Müller, S., Goletz, S., Packer, N., Gooley, A., Lawson, A. M. & Hanisch, F. G.: 1997, Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets in vivo., *J Biol Chem* **272**(40), 24780–24793.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H.: 1986, Specific enzymatic amplification of dna in vitro: the polymerase chain reaction., *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263–273.
- Nakamura, H., Hinoda, Y., Nakagawa, N., Makiguchi, Y., Itoh, F., Endo, T. & Imai, K.: 1998, Detection of circulating anti-MUC1 mucin core protein antibodies in patients with colorectal cancer., *J Gastroenterol* **33**(3), 354–361.
- Neri, D., de Lalla, C., Petrucci, H., Neri, P. & Winter, G.: 1995, Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments., *Biotechnology (N Y)* **13**(4), 373–377.
- Nguyen, A. W. & Daugherty, P. S.: 2003, Production of randomly mutated plasmid libraries using mutator strains., *Methods Mol Biol* **231**, 39–44.
- Nielsen, U. B., Adams, G. P., Weiner, L. M. & Marks, J. D.: 2000, Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity., *Cancer Res* **60**(22), 6434–6440.
- Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knüpfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D. & Plückthun, A.: 1993, Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of Escherichia coli., *Biotechnology (N Y)* **11**(11), 1271–1277.
- Pack, P., Müller, K., Zahn, R. & Plückthun, A.: 1995, Tetravalent miniantibodies with high avidity assembling in Escherichia coli., *J Mol Biol* **246**(1), 28–34.
- Pack, P. & Plückthun, A.: 1992, Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric FV fragments with high avidity in Escherichia coli., *Biochemistry* **31**(6), 1579–1584.
- Pandey, P., Kharbanda, S. & Kufe, D.: 1995, Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein., *Cancer Res* **55**(18), 4000–4003.
- Park, S. G., Lee, J. S., Je, E. Y., Kim, I. J., Chung, J. H. & Choi, I. H.: 2000, Affinity maturation of natural antibody using a chain shuffling technique and the expression of recombinant antibodies in Escherichia coli., *Biochem Biophys Res Commun* **275**(2), 553–557.
- Park, S. S., Kim, J., Brandts, J. F. & Hong, H. J.: 2003, Stability of murine, chimeric and humanized antibodies against pre-S2 surface antigen of hepatitis B virus., *Biologicals* **31**(4), 295–302.
- Parmley, S. F. & Smith, G. P.: 1988, Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes., *Gene* **73**(2), 305–318.

- Parry, G., Beck, J. C., Moss, L., Bartley, J. & Ojakian, G. K.: 1990, Determination of apical membrane polarity in mammary epithelial cell cultures: the role of cell-cell, cell-substratum, and membrane-cytoskeleton interactions., *Exp Cell Res* **188**(2), 302–311.
- Pavoni, E., Flego, M., Dupuis, M. L., Barca, S., Petronzelli, F., Anastasi, A. M., D'Alessio, V., Pelliccia, A., Vaccaro, P., Monteriù, G., Ascione, A., Santis, R. D., Felici, F., Cianfriglia, M. & Minenkova, O.: 2006, Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein., *BMC Cancer* **6**, 41.
- Pericleous, L. M., Richards, J., Epenetos, A. A., Courtenay-Luck, N. & Deonarain, M. P.: 2005, Characterisation and internalisation of recombinant humanised HMFG-1 antibodies against MUC1., *Br J Cancer* **93**(11), 1257–1266.
- Petrakou, E., Murray, A. & Price, M. R.: 1998, Epitope mapping of anti-MUC1 mucin protein core monoclonal antibodies., *Tumour Biol* **19 Suppl 1**, 21–29.
- Petrarca, C., Rughetti, A., Rahimi, H., D'Agostini, F., Turchi, V., Ghetti, C. A., Scambia, G., Frati, L. & Nuti, M.: 1996, Human antibodies against the polymorphic epithelial mucin in ovarian cancer patients recognise a novel sequence in the tandem repeat region., *Eur J Cancer* **32A**(12), 2155–2163.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T. & Burmester, G.-R.: 2006, *Taschenatlas der Immunologie*, 2. Auflage, Thieme.
- Pietersz, G. A., Wenjun, L., Krauer, K., Baker, T., Wreschner, D. & McKenzie, I. F.: 1997, Comparison of the biological properties of two anti-mucin-1 antibodies prepared for imaging and therapy., *Cancer Immunol Immunother* **44**(6), 323–328.
- Plückthun, A. & Pack, P.: 1997, New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments., *Immunotechnology* **3**(2), 83–105.
- Price, M. R., Rye, P. D., Petrakou, E., Murray, A., Brady, K., Imai, S., Haga, S., Kiyozuka, Y., Schol, D., Meulenbroek, M. F., Snijdwint, F. G., von Mensdorff-Pouilly, S., Verstraeten, R. A., Kenemans, P., Blockzijl, A., Nilsson, K., Nilsson, O., Reddish, M., Suresh, M. R., Koganty, R. R., Fortier, S., Baronie, L., Berg, A., Longenecker, M. B. & Hilgers, J.: 1998, Summary report on the ISOBM TD-4 Workshop: analysis of 56 monoclonal antibodies against the MUC1 mucin. San Diego, Calif., November 17-23, 1996., *Tumour Biol* **19 Suppl 1**, 1–20.
- Pschyrembel, W.: 1993, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 257. Auflage, Walter de Gruyter.
- Retter, I., Althaus, H. H., Münch, R. & Müller, W.: 2005, VBASE2, an integrative V gene database., *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue), D671–D674.
- Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L. L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Plückthun, A. & Pack, P.: 1996, Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen., *J Immunol* **157**(7), 2989–2997.

- Robert Koch-Institut: 2007, Krebs in Deutschland 2003/2004 - Häufigkeiten und Trends, Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- Rondot, S., Koch, J., Breitling, F. & Dübel, S.: 2001, A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display., *Nat Biotechnol* **19**(1), 75–78.
- Roskos, L., Klakamp, S., Liang, M., Arends, R. & Green, L.: 2007, Molecular Engineering II: Antibody Affinity, in Dübel, S. (Ed.), *Handbook of Therapeutic Antibodies*, Wiley-VCH, pp. 145–169.
- Safi, F., Kohler, I., Röttinger, E. & Beger, H.: 1991, The value of the tumor marker CA 15-3 in diagnosing and monitoring breast cancer. A comparative study with carcinoembryonic antigen., *Cancer* **68**(3), 574–582.
- Sainsbury, J. R., Anderson, T. J. & Morgan, D. A.: 2000, ABC of breast diseases: breast cancer., *BMJ* **321**(7263), 745–750.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F. & Petersen, G. B.: 1982, Nucleotide sequence of bacteriophage lambda dna., *J Mol Biol* **162**(4), 729–773.
- Sblattero, D. & Bradbury, A.: 2000, Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries., *Nat Biotechnol* **18**(1), 75–80.
- Schatz, P. J.: 1993, Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in Escherichia coli., *Biotechnology (N Y)* **11**(10), 1138–1143.
- Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., Decker, S. J., Drebin, J. A., Greene, M. I. & Weinberg, R. A.: 1984, The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen., *Nature* **312**(5994), 513–516.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. & Marks, J. D.: 1996, Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection., *J Mol Biol* **255**(1), 28–43.
- Schier, R. & Marks, J. D.: 1996, Efficient in vitro affinity maturation of phage antibodies using BIAcore guided selections., *Hum Antibodies Hybridomas* **7**(3), 97–105.
- Schirrmann, T., Al-Halabi, L., Dübel, S. & Hust, M.: 2008, Production systems for recombinant antibodies., *Frontiers in Bioscience* **in press**.
- Schlee, D. & Kleber, H.-P.: 1991, *Wörterbuch der Biologie: Biotechnologie*, Gustav Fischer Verlag Jena.
- Schmiedl, A., Breitling, F. & Dübel, S.: 2000a, Expression of a bispecific dsFv-dsFv' antibody fragment in Escherichia coli., *Protein Eng* **13**(10), 725–734.

- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C. H., Queitsch, I. & Dübel, S.: 2000b, Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*., *J Immunol Methods* **242**(1-2), 101–114.
- Schmiedl, A. & Dübel, S.: 2004, Rekombinante Antikörper & Phagendisplay, in Wink, M. (Ed.), *Molekulare Biotechnologie*, Wiley-VCH, pp. 511–542.
- Schroeder, J. A., Thompson, M. C., Gardner, M. M. & Gendler, S. J.: 2001, Transgenic muc1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland., *J Biol Chem* **276**(16), 13057–13064.
- Shu, L., Qi, C. F., Schlom, J. & Kashmiri, S. V.: 1993, Secretion of a single-gene-encoded immunoglobulin from myeloma cells., *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17), 7995–7999.
- Siddiqui, J., Abe, M., Hayes, D., Shani, E., Yunis, E. & Kufe, D.: 1988, Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen., *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(7), 2320–2323.
- Singh, R., Samant, U., Hyland, S., Chaudhari, P. R., Wels, W. S. & Bandyopadhyay, D.: 2007, Target-specific cytotoxic activity of recombinant immunotoxin scFv(MUC1)-ETA on breast carcinoma cells and primary breast tumors., *Mol Cancer Ther* **6**(2), 562–569.
- Skerra, A. & Plückthun, A.: 1988, Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*., *Science* **240**(4855), 1038–1041.
- Smith, G. P.: 1985, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface., *Science* **228**(4705), 1315–1317.
- Snijderwint, F. G., von Mensdorff-Pouilly, S., Karuntu-Wanamarta, A. H., Verstraeten, A. A., Livingston, P. O., Hilgers, J. & Kenemans, P.: 2001, Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients., *Int J Cancer* **93**(1), 97–106.
- Soltes, G., Hust, M., Ng, K. K. Y., Bansal, A., Field, J., Stewart, D. I. H., Dübel, S., Cha, S. & Wiersma, E. J.: 2007, On the influence of vector design on antibody phage display., *J Biotechnol* **127**(4), 626–637.
- Spicer, A. P., Parry, G., Patton, S. & Gendler, S. J.: 1991, Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism., *J Biol Chem* **266**(23), 15099–15109.
- Statistisches Bundesamt: 2007, Todesursachen in Deutschland 2006.
- Stauber, M. & Weyerstahl, T.: 2007, *Gynäkologie und Geburtshilfe*, 3. Auflage, Thieme.
- Stemmer, W. P.: 1994a, Dna shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution., *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10747–10751.

- Stemmer, W. P.: 1994b, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling., *Nature* **370**(6488), 389–391.
- Swallow, D. M., Gendler, S., Griffiths, B., Corney, G., Taylor-Papadimitriou, J. & Bramwell, M. E.: 1987, The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM., *Nature* **328**(6125), 82–84.
- Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., Miles, D. W. & Dalziel, M.: 1999, Muc1 and cancer., *Biochim Biophys Acta* **1455**(2-3), 301–313.
- Taylor-Papadimitriou, J., Peterson, J. A., Arklie, J., Burchell, J., Ceriani, R. L. & Bodmer, W. F.: 1981, Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: production and reaction with cells in culture., *Int J Cancer* **28**(1), 17–21.
- Telli, M. L., Hunt, S. A., Carlson, R. W. & Guardino, A. E.: 2007, Trastuzumab-related cardiotoxicity: calling into question the concept of reversibility., *J Clin Oncol* **25**(23), 3525–3533.
- Thie, H., Voedisch, B., Dübel, S., Hust, M. & Schirrmann, T.: 2008, Affinity maturation by phage display, *Methods Mol Biol* **in press**.
- Toleikis, L.: 2004, *Rekombinante Antikörper gegen tumorassoziiertes MUC1*, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Toleikis, L., Li, J., von Wasielewski, R. & Dübel, S.: 2006, A human Antibody for targeting Adenocarcinomas (Poster), *IBC's 17th Annual International Conference Antibody Engineering, Dezember 2006, San Diego, CA, USA*.
- Verhoeyen, M. E., Saunders, J. A., Price, M. R., Marugg, J. D., Briggs, S., Broderick, E. L., Eida, S. J., Mooren, A. T. & Badley, R. A.: 1993, Construction of a reshaped HMFG1 antibody and comparison of its fine specificity with that of the parent mouse antibody., *Immunology* **78**(3), 364–370.
- Vieira, J. & Messing, J.: 1987, Production of single-stranded plasmid DNA., *Methods Enzymol* **153**, 3–11.
- Vimal, D. B., Khullar, M., Gupta, S. & Ganguly, N. K.: 2000, Intestinal mucins: the binding sites for Salmonella typhimurium., *Mol Cell Biochem* **204**(1-2), 107–117.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. & Beck-Sickinger, A. G.: 2002, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH.
- von Behring, E. & Kitasato, S.: 1890, Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **16**(12), 1113–1114.
- von Mensdorff-Pouilly, S., Petrakou, E., Kenemans, P., van Uffelen, K., Verstraeten, A. A., Snijdwint, F. G., van Kamp, G. J., Schol, D. J., Reis, C. A., Price, M. R., Livingston, P. O. &

- Hilgers, J.: 2000b, Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with MUC1 peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides., *Int J Cancer* **86**(5), 702–712.
- von Mensdorff-Pouilly, S., Snijdwint, F. G., Verstraeten, A. A., Verheijen, R. H. & Kenemans, P.: 2000a, Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein., *Int J Biol Markers* **15**(4), 343–356.
- Webster, R.: 2001, Filamentous Phage Biology, in Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. (Eds.), *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1.1–1.37.
- Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U. & Plückthun, A.: 1999, High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment., *Cancer Res* **59**(22), 5758–5767.
- Willuda, J., Kubetzko, S., Waibel, R., Schubiger, P. A., Zangemeister-Wittke, U. & Plückthun, A.: 2001, Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185(HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides., *J Biol Chem* **276**(17), 14385–14392.
- Wörn, A. & Plückthun, A.: 2001, Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments., *J Mol Biol* **305**(5), 989–1010.
- Yamamoto, M., Bharti, A., Li, Y. & Kufe, D.: 1997, Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion., *J Biol Chem* **272**(19), 12492–12494.
- Yau, K. Y. F., Dubuc, G., Li, S., Hirama, T., Mackenzie, C. R., Jermutus, L., Hall, J. C. & Tanha, J.: 2005, Affinity maturation of a V(H)H by mutational hotspot randomization., *J Immunol Methods* **297**(1-2), 213–224.
- Yuan, B., Schulz, P., Liu, R. & Sierks, M. R.: 2006, Improved affinity selection using phage display technology and off-rate based selection, *Electron J Biotechnol* **9**, 171–175.
- Zaccolo, M. & Gherardi, E.: 1999, The effect of high-frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta-lactamase., *J Mol Biol* **285**(2), 775–783.
- Zotter, S., Hageman, P., Lossnitzer, A., Mooi, W. J. & Hilgers, J.: 1988, Polymorphic epithelial mucin and CA125-Bearing Glycoprotein As Tumor-Associated Antigens., in Hilgers, J. & Zotter, S. (Eds.), *Cancer Reviews*, Vol. 11/12, chapter Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin., pp. 55–101.

A Anhang

A.1 Produktion und Aufreinigung von scFv-Fragmenten

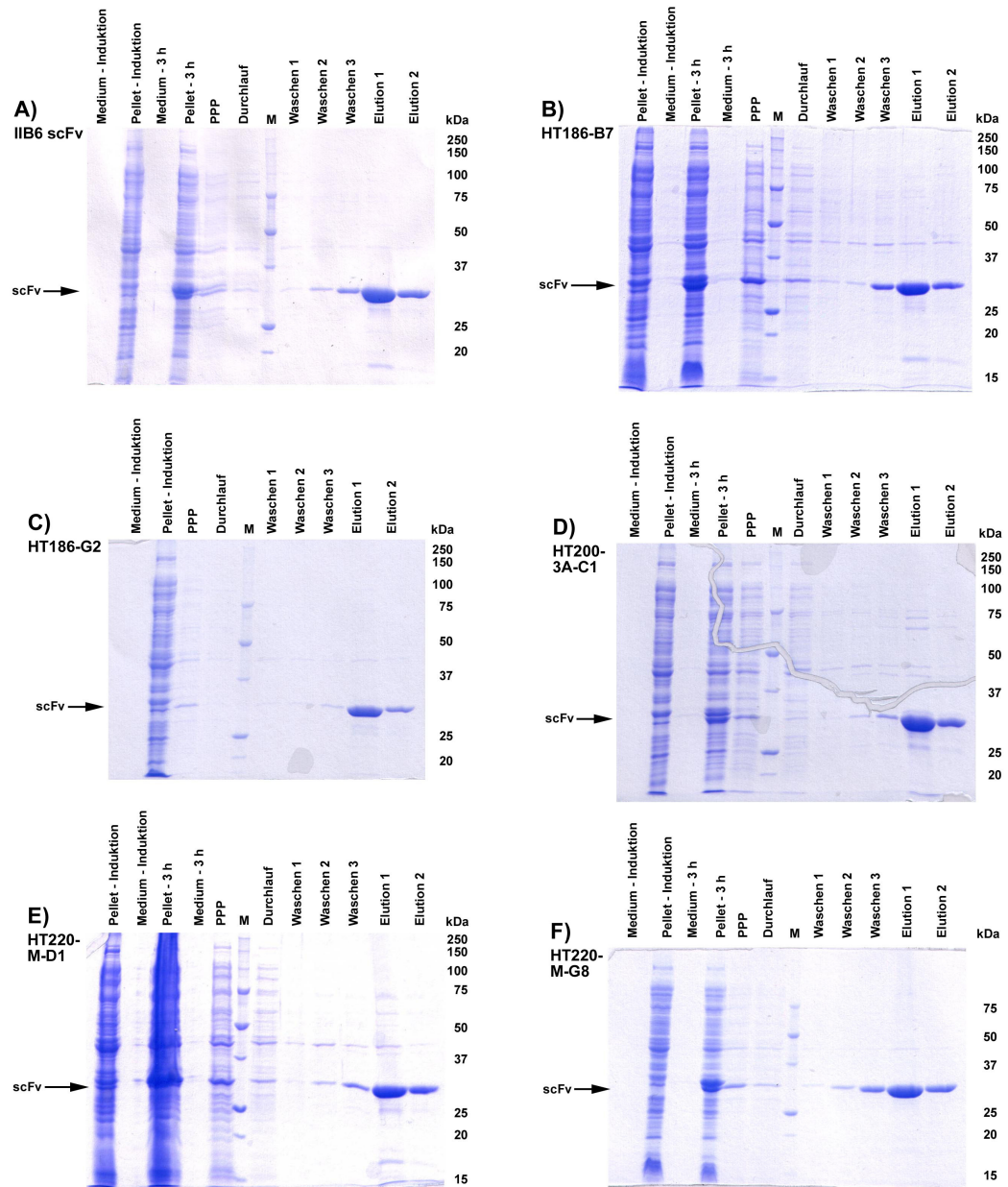


Abb. A.1: Produktion und Aufreinigung der scFv-Fragmente

A) IIB6 scFv, **B)** HT186-B7, **C)** HT186-G2. **D)** HT200-3A-C1, **E)** HT220-M-D1, **F)** HT220-M-G8.

Während der Produktion und Aufreinigung wurde von allen Fraktionen ein 100 µL Aliquot entnommen und auf einem 12 %igen SDS-PAA Gel aufgetrennt. M = molekularer Massenstandard. Die Protein-Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R250. Pro Spur wurden 8 µL Probe geladen.

A.2 Humanness-Analysen

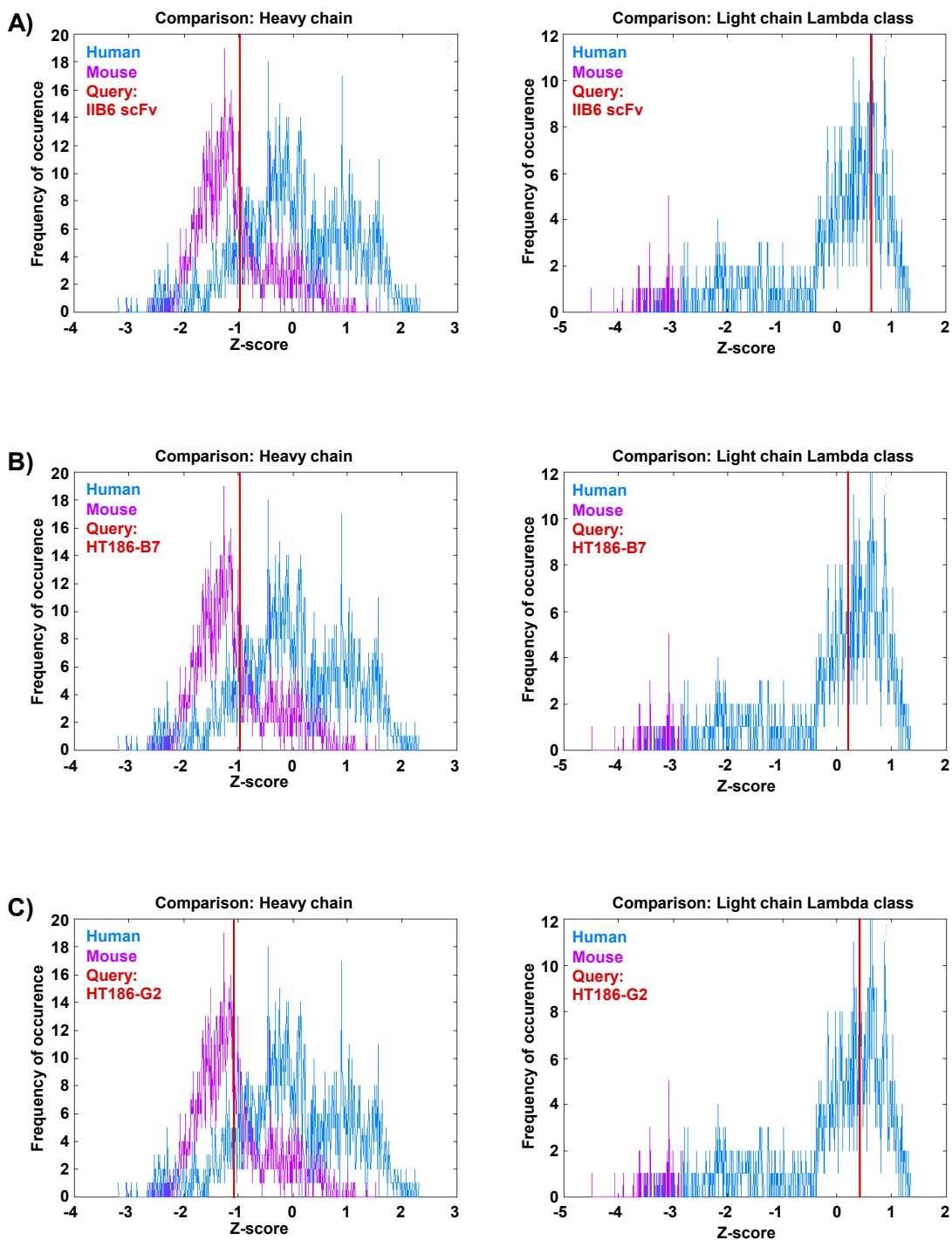


Abb. A.2: Humanness-Analyse

Dargestellt sind die Ergebnisse der *Humanness*-Analyse für V_H und V_L für die Klone: **A)** IIB6 scFv, **B)** HT186-B7, **C)** HT186-G2.

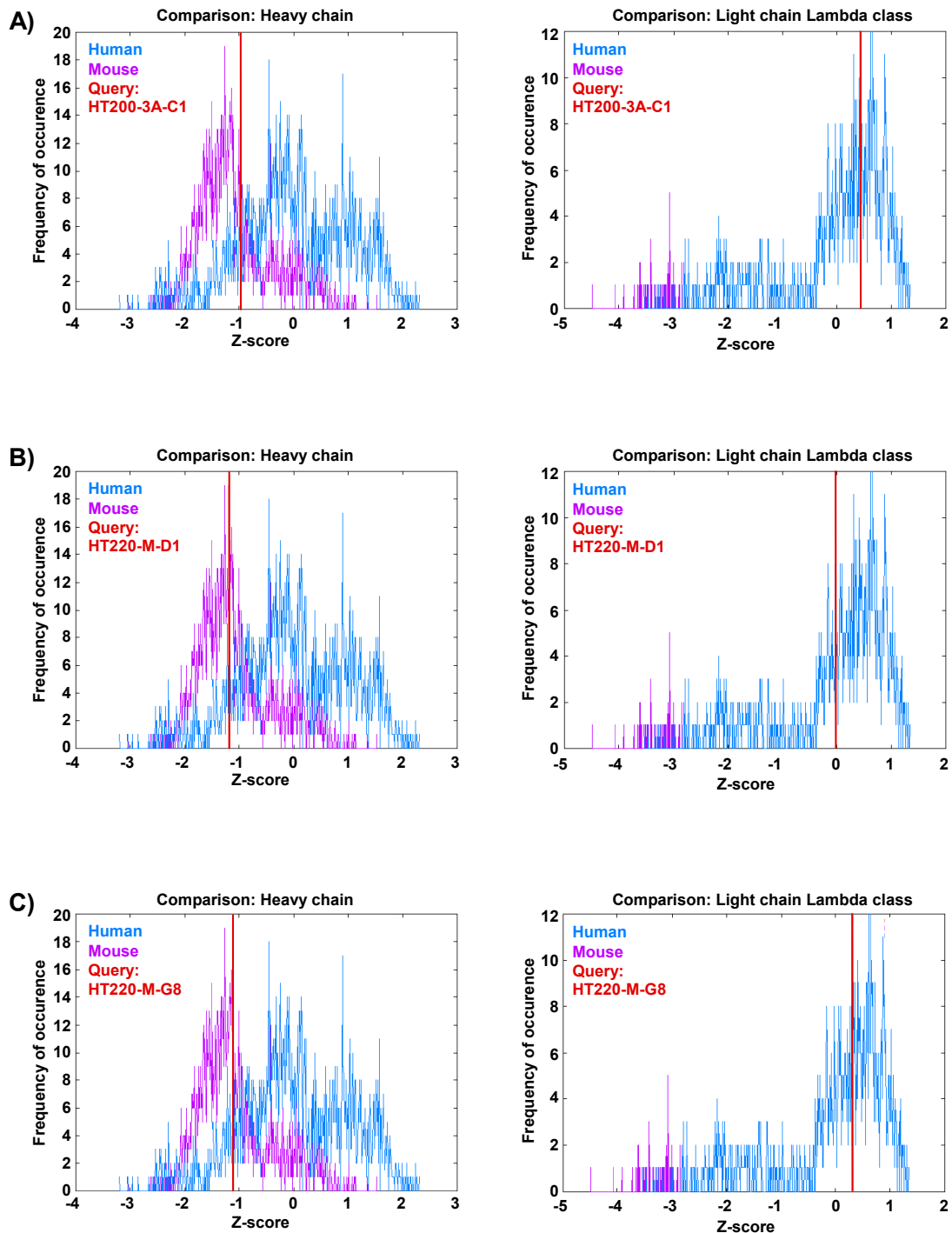


Abb. A.3: Humanness-Analyse

Dargestellt sind die Ergebnisse der *Humanness*-Analyse für V_H und V_L für die Klone: **A)** HT200-3A-C1, **B)** HT220-M-D1, **C)** HT220-M-G8.

A.3 SPR-Analysen zur Affinitätsbestimmung

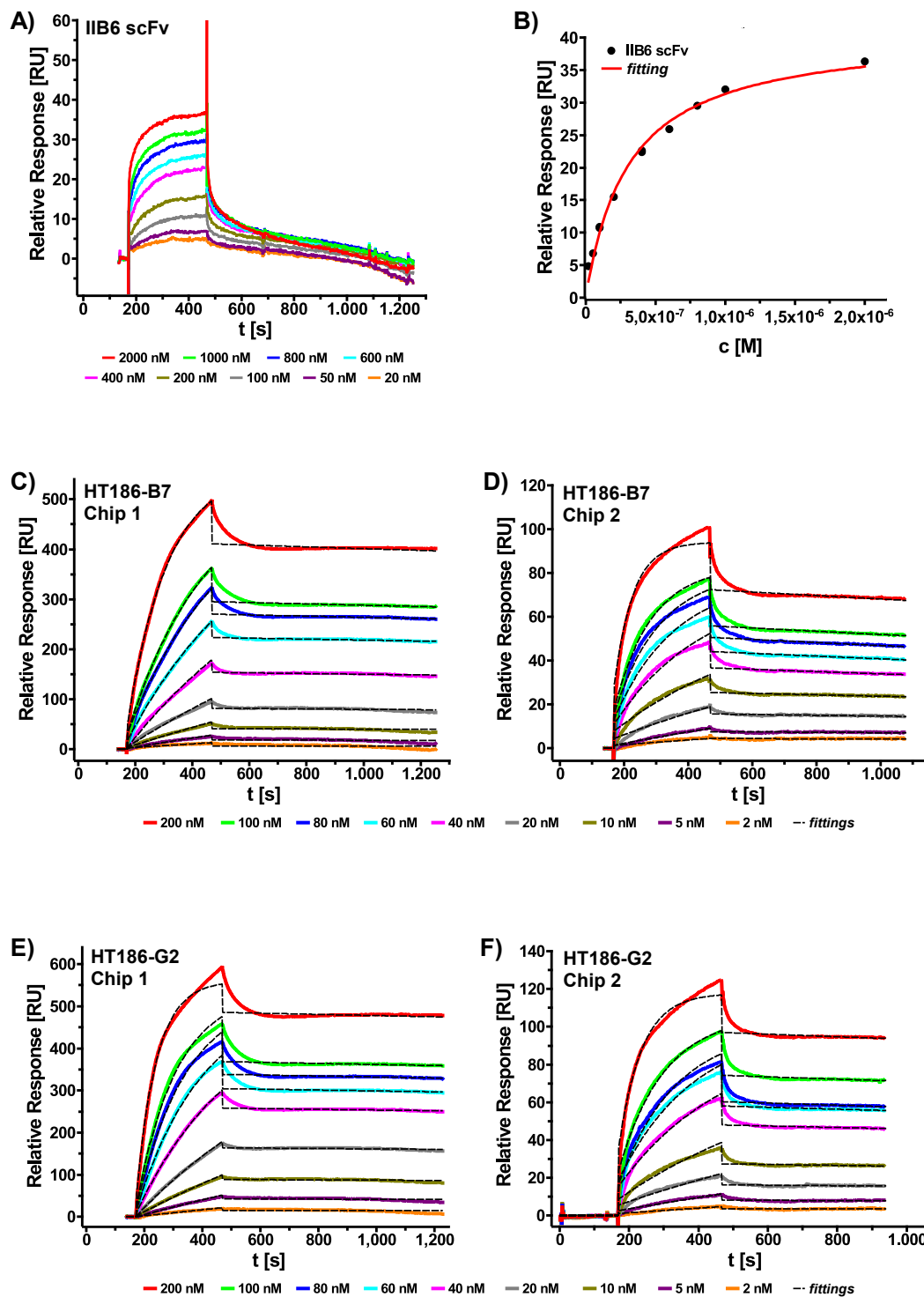


Abb. A.4: Sensogramme der Affinitätsbestimmung

A) IIB6 scFv, **B)** IIB6 *steady-state* Auswertung, **C)** HT186-B7 - Chip 1, **D)** HT186-B7 - Chip 2, **E)** HT186-G2 - Chip 1, **F)** HT186-G2 - Chip 2.

Chip 1 = 47 RU MUC1-Peptid (15 AS Cys), Chip 2 = 14 RU MUC1-Peptid (15 AS Cys)

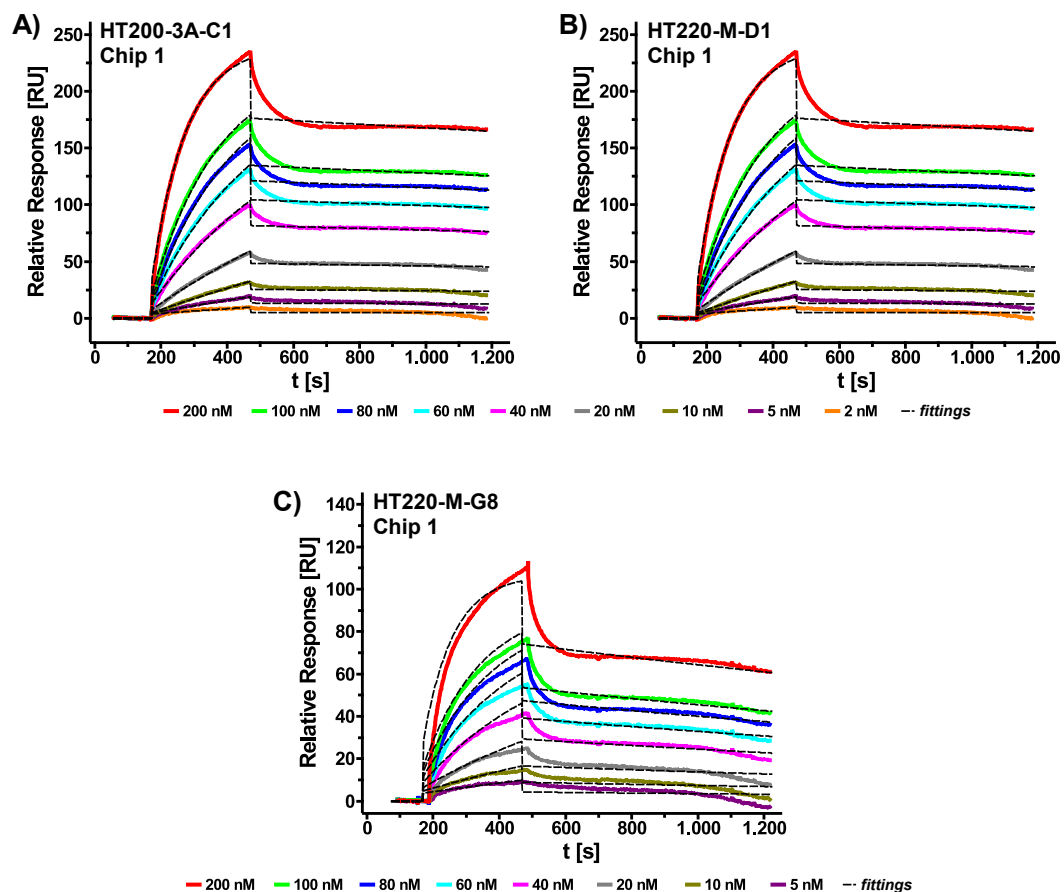
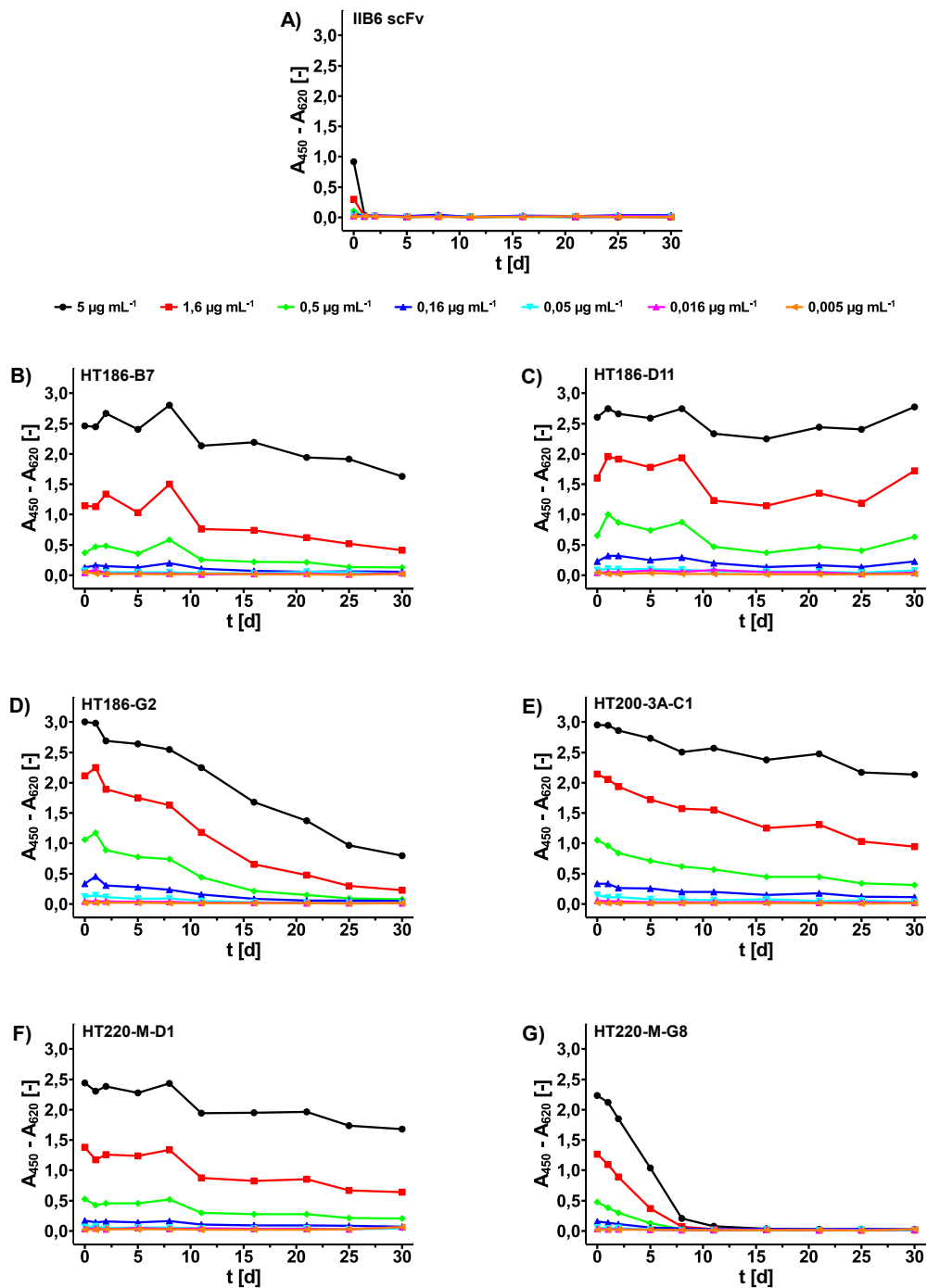


Abb. A.5: Sensogramme der Affinitätsbestimmung

A) HT200-3A-C1 - Chip 1, **B)** HT220-M-D1 - Chip 1, **C)** HT220-M-G8 - Chip 1.
 Chip 1 = 47 RU MUC1-Peptid (15 AS Cys)

A.4 Stabilitätsanalyse

**Abb. A.6: ELISA: scFv-Stabilitätstest**

A) IIB6 scFv, **B)** HT186-B7, **C)** HT186-D11, **D)** HT186-G2, **E)** HT200-3A-C1, **F)** HT220-M-D1, **G)** HT220-M-G8.

Verschiedene Konzentrationen der scFv-Fragmente wurden im Antigen-ELISA auf Bindung an MUC1-Peptid untersucht. Jede Kavität wurde mit 50 ng MUC1-Peptid (32 AS Cys) beschichtet. Der Nachweis der gebundenen scFv-Fragmente erfolgte über Maus- α -c-myc-IgG 9E10 und Ziege- α -Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB.

A.5 ELISA-Analyse mit verdünnten multimeren scFv-Fragmenten

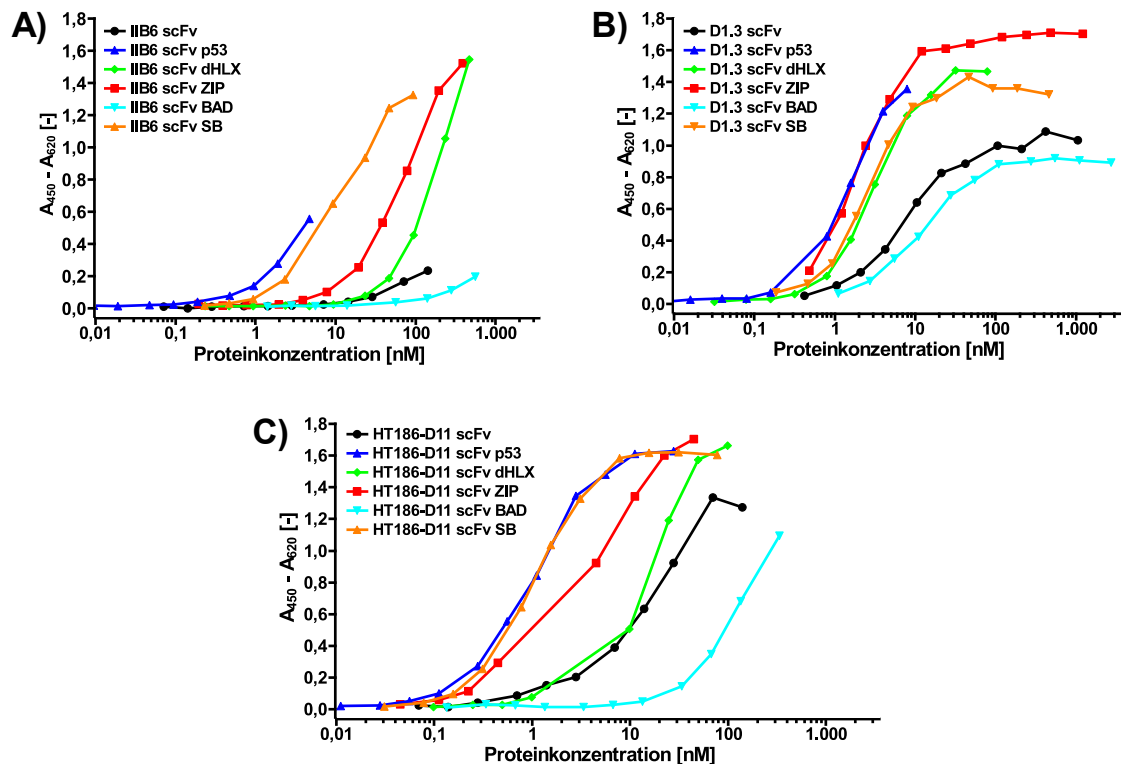


Abb. A.7: ELISA mit verdünnten multimeren scFv-Fragmenten

A) Ergebnisse für alle Varianten von D1.3 scFv **B)** IIB6 scFv **C)** HT186-D11 scFv. SB = *Streptabody*. Verschiedene Konzentrationen der multimerisierten scFv-Fragmente wurden im Antigen-ELISA auf Bindung an das korrespondierende Antigen untersucht. Es sind die absoluten Konzentrationen der Varianten angegeben. Jede Vertiefung wurde mit 1 µg Antigen (MUC1-Peptid (32 AS Cys) (IIB6, HT186-D11) oder Lysozym (D1.3)) beschichtet. Der Nachweis der gebundenen scFv erfolgte über Maus-α-His₆-IgG und Ziege-α-Maus-IgG (Fab spez.) HRP-Konjugat, Substrat: TMB.

